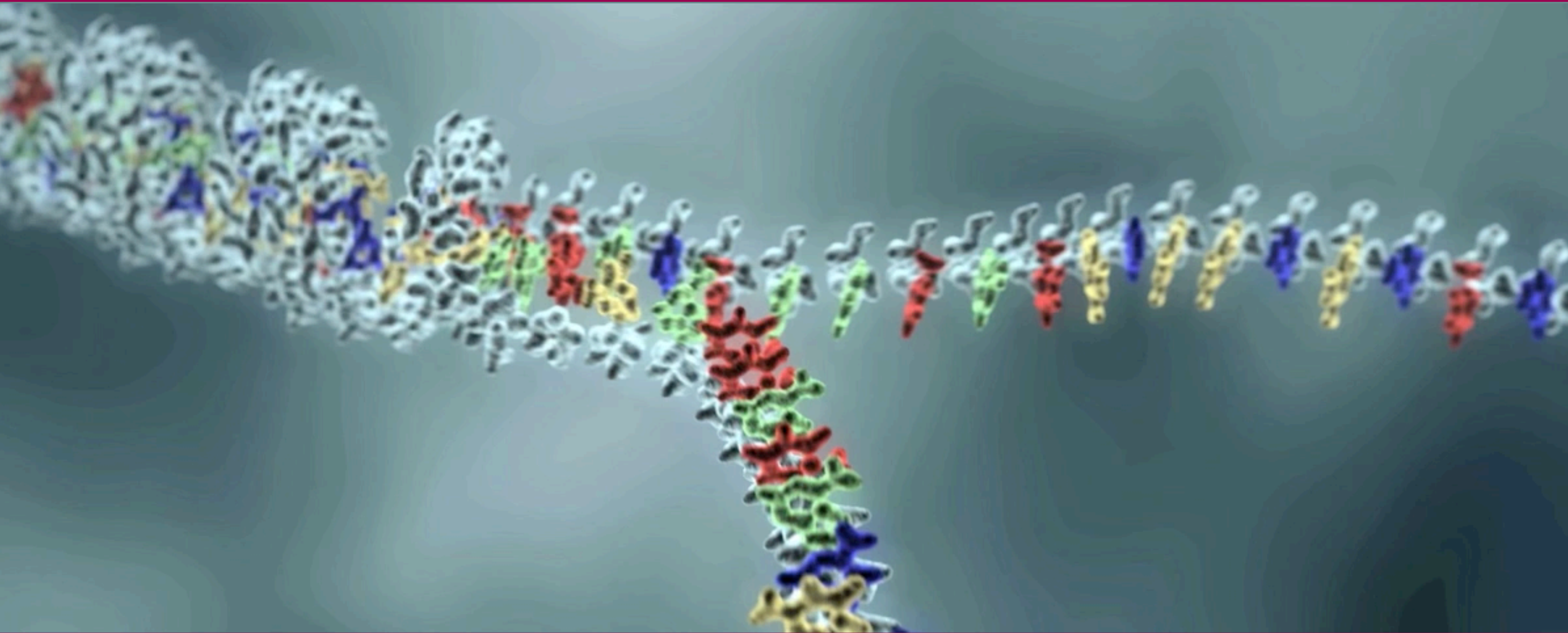


2- Réplication de l'ADN



Credits: EQUINOX GRAPHICS / SCIENCE SOURCE

Prof. Guillaume Andrey

De la molécule à la cellule: *de l'ADN à la protéine*



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

Le dogme centrale



Réplication de l'ADN

- 1- La réplication semi-conservative***
- 2- Yeux, fourches et domaines de rélications***
- 3- Le "mix" réplicatif***
- 4- Synthèse de l'ADN***
- 5- Initiation de la réplication***
- 6- Elongation de la réplication***
- 7- La fidélité lors de la réplication***
- 8- Le problème topologique***
- 9- Les télomères***
- 10- Applications***

Réplication de l'ADN

1- La réplication semi-conservative

2- Yeux, fourches et domaines de rélications

3- Le "mix" réplicatif

4- Synthèse de l'ADN

5- Initiation de la réplication

6- Elongation de la réplication

7- La fidélité lors de la réplication

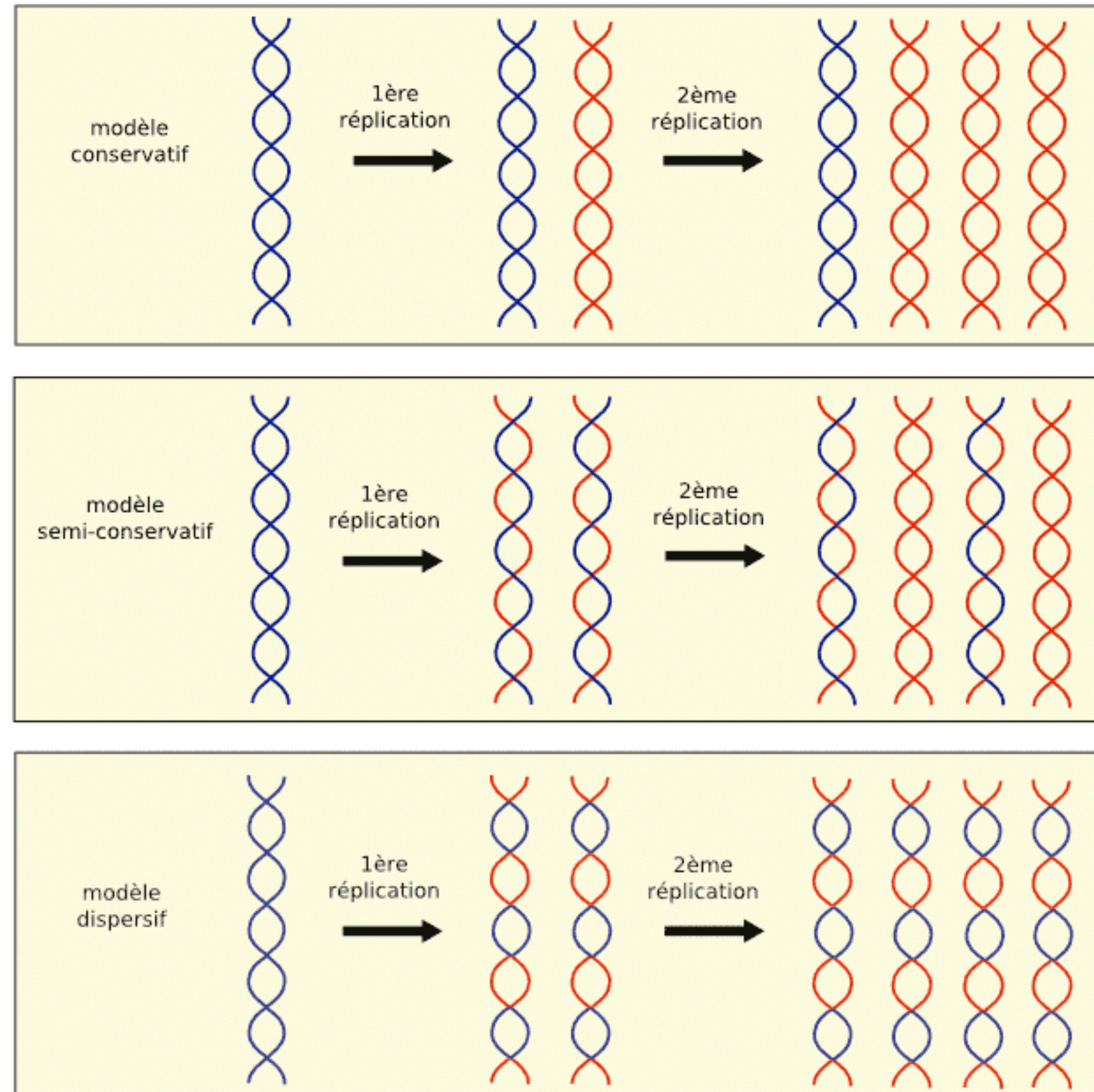
8- Le problème topologique

9- Les télomères

10- Applications

La réplication semi-conservative

1- Plusieurs modèles veulent expliquer la réplication



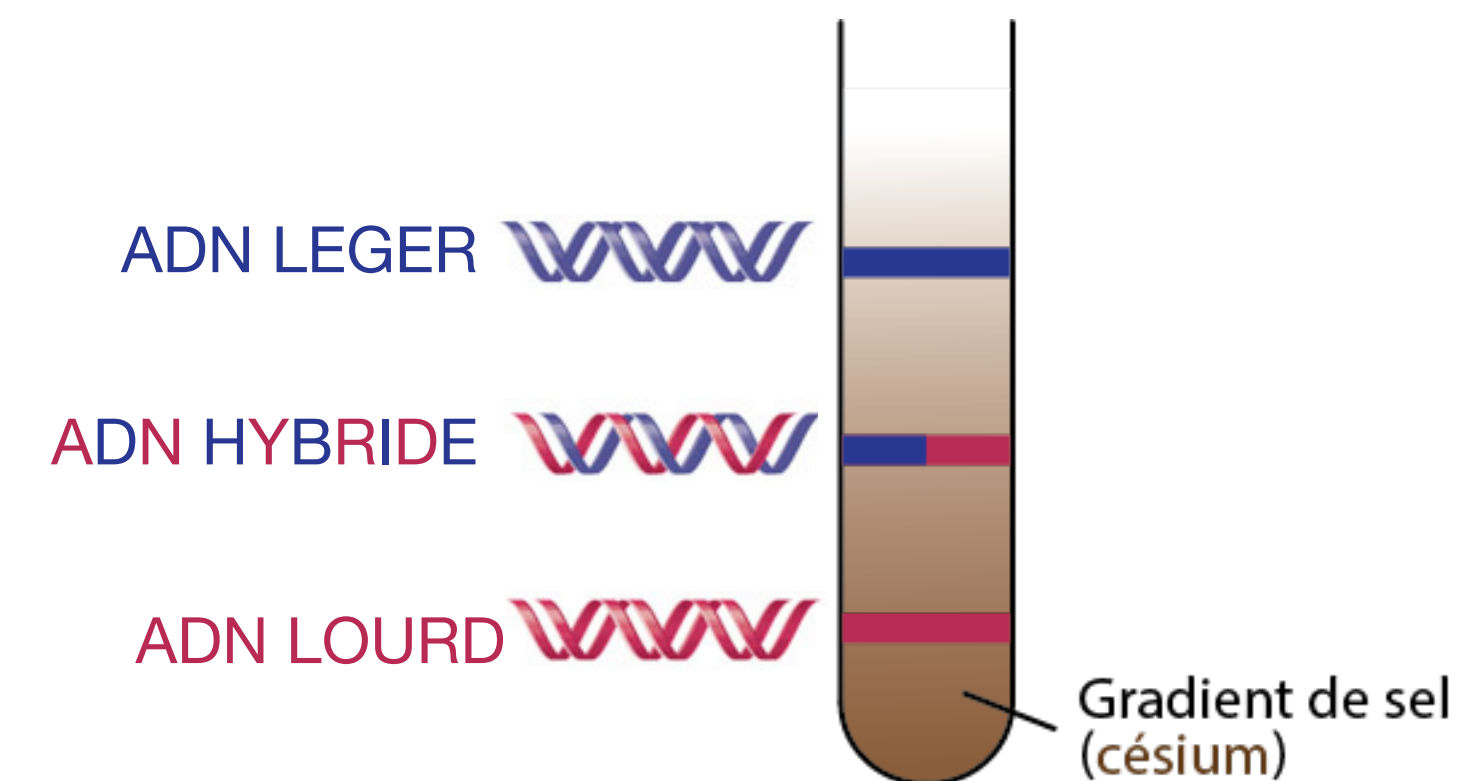
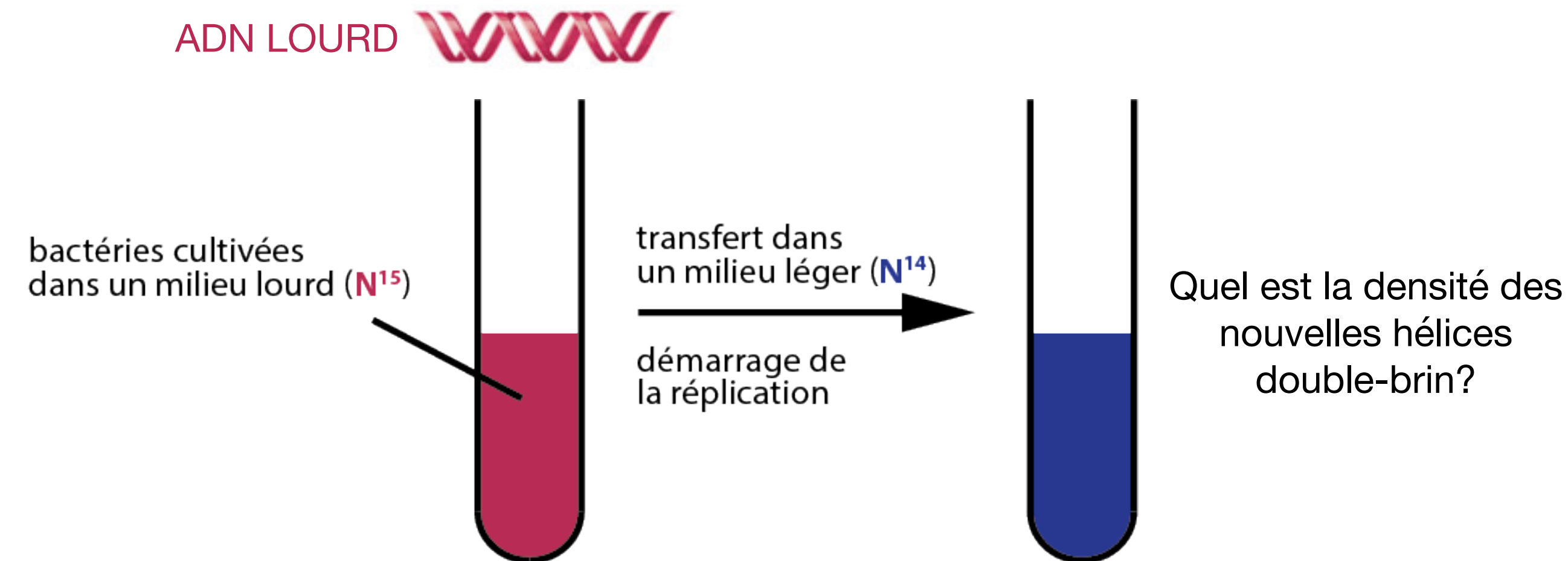
La réplication semi-conservative

2- L'expérience de Meselson et Stahl

1- Meselson et Stahl prennent des bactéries et les incubent avec de l'azote N^{15} (au lieu de N^{14} qui est plus léger)

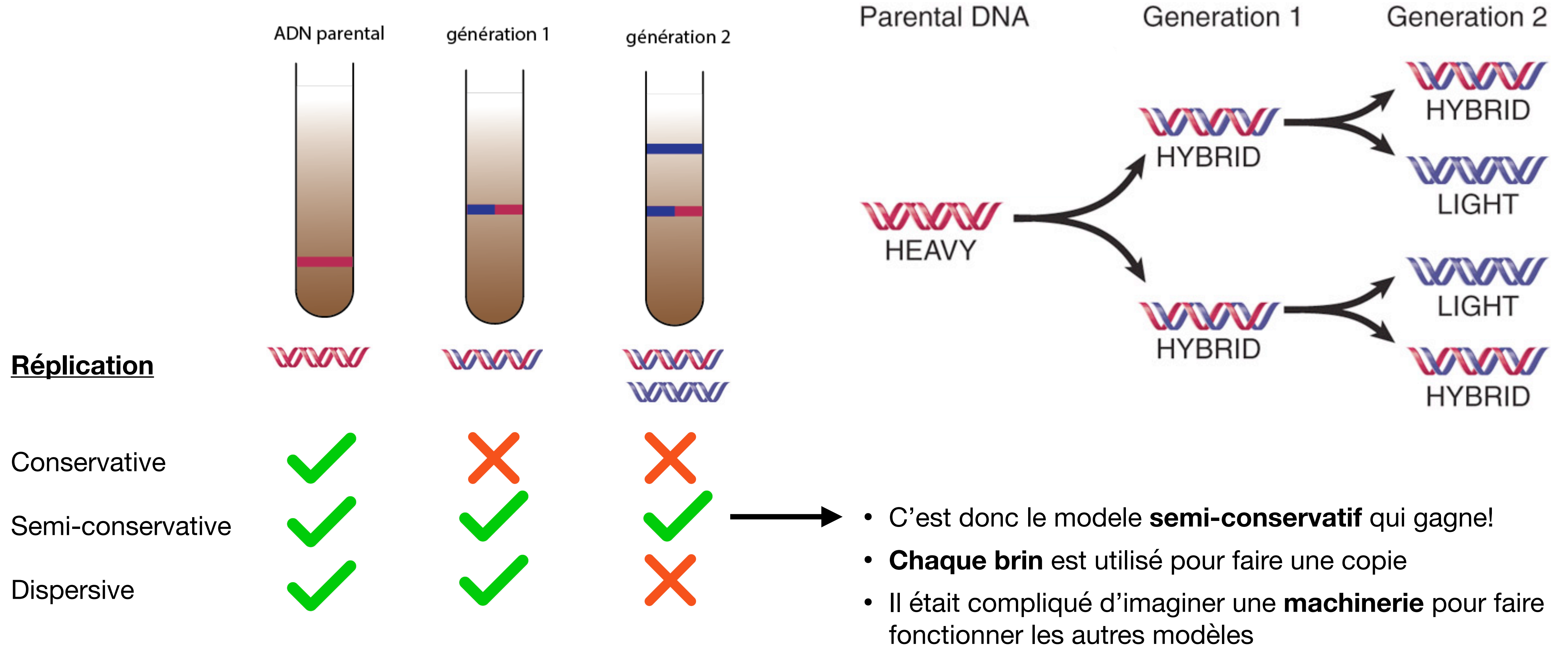
2- Ils laissent ensuite les bactéries se diviser dans du milieu léger N^{14} pour marquer les nouveaux brins

3- Pour mesurer la différence de poids de l'ADN, ils inventent la technique de **centrifugation** dans un gradient de césium (sel)



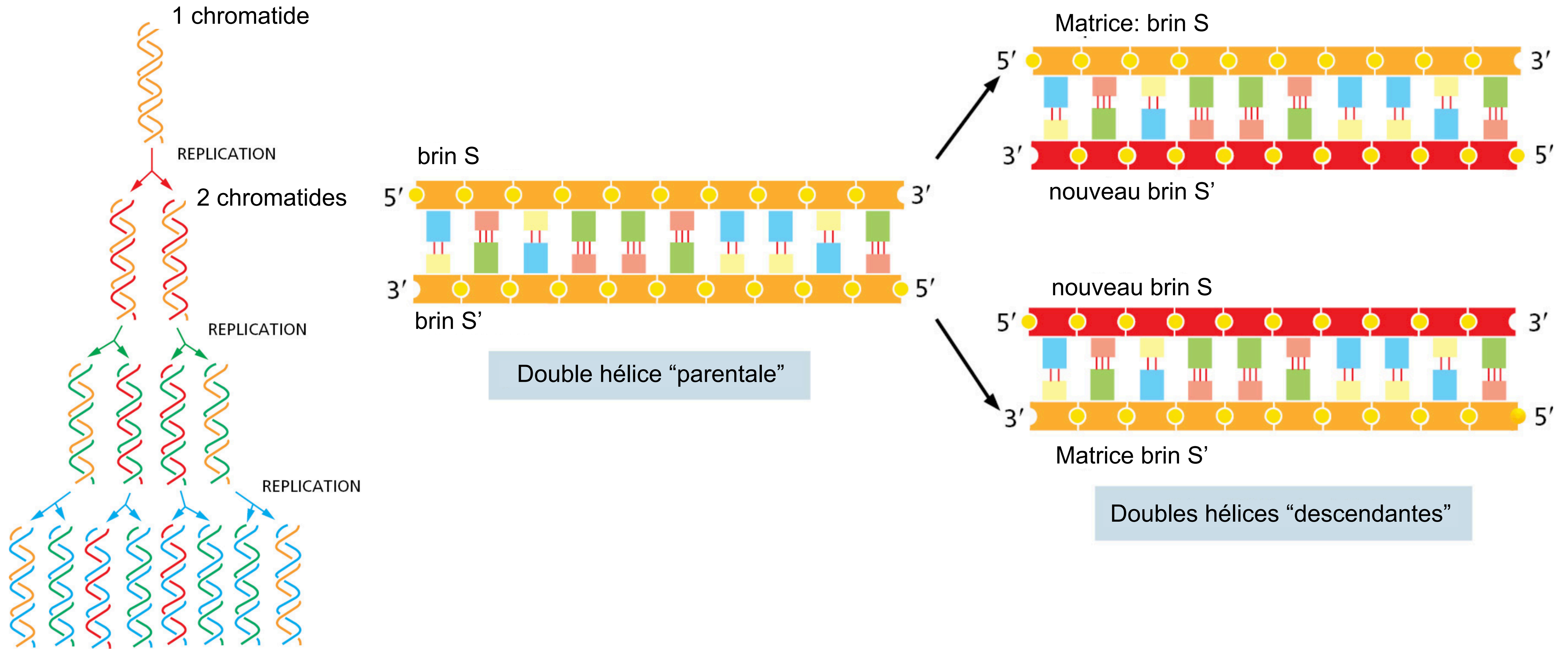
La réplication semi-conservative

2- L'expérience de Meselson et Stahl



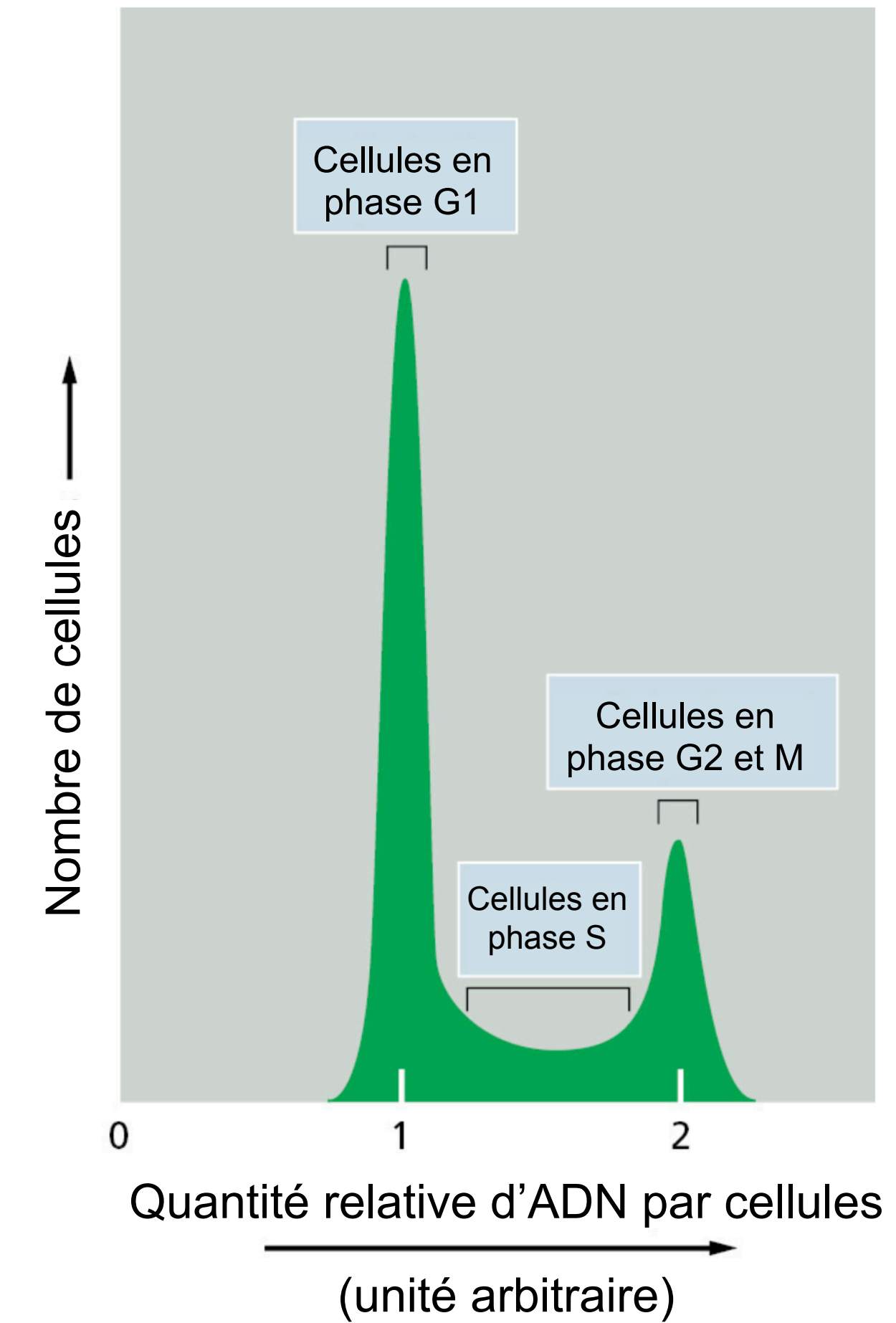
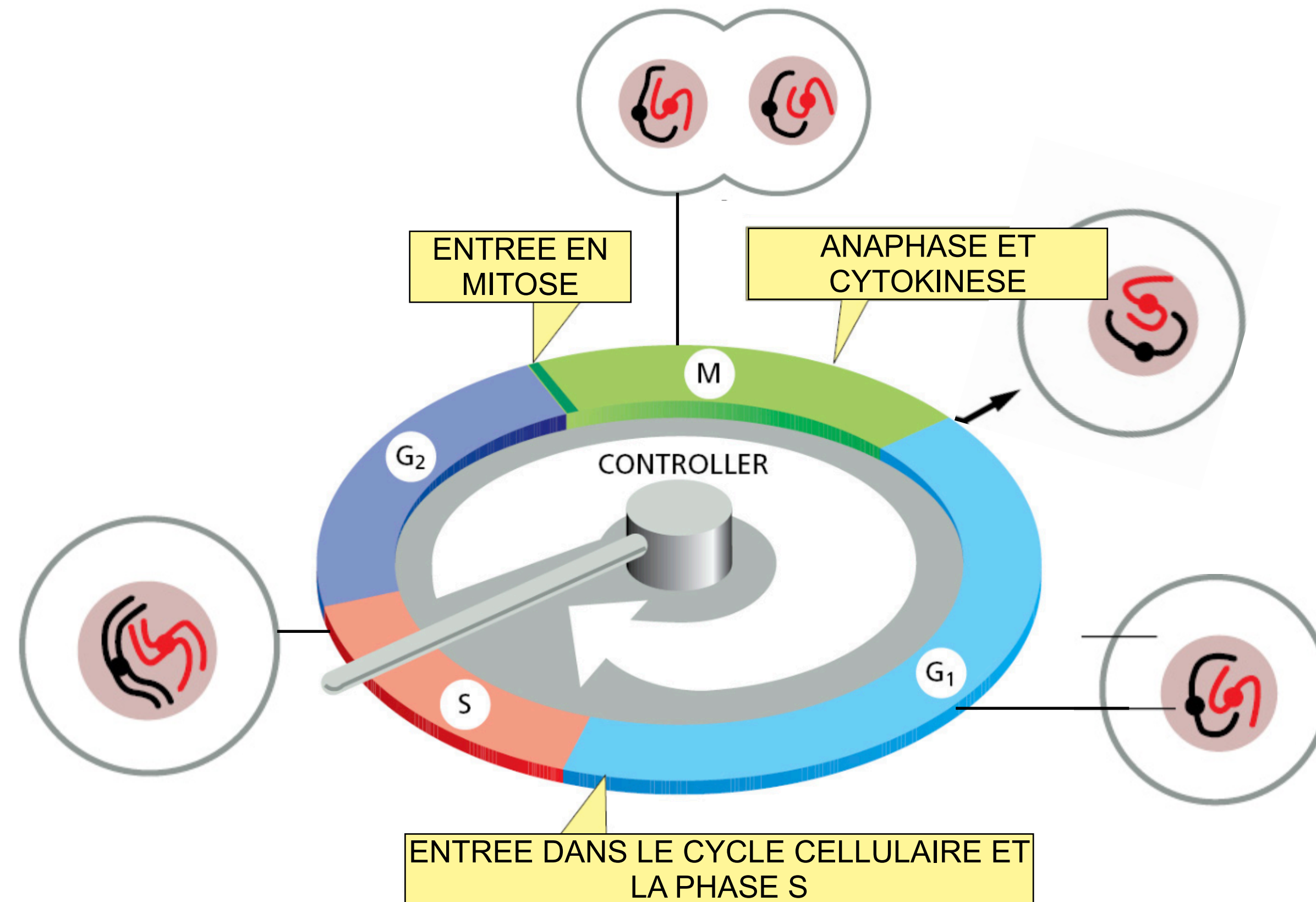
La réplication semi-conservative

3- La complémentarité est essentiel



La réplication semi-conservative

4- Quelle phase du cycle cellulaire?



Réplication de l'ADN

1- La réplication semi-conservative

2- Yeux, fourches et domaines de rélications

3- Le "mix" réplicatif

4- Synthèse de l'ADN

5- Initiation de la réplication

6- Elongation de la réplication

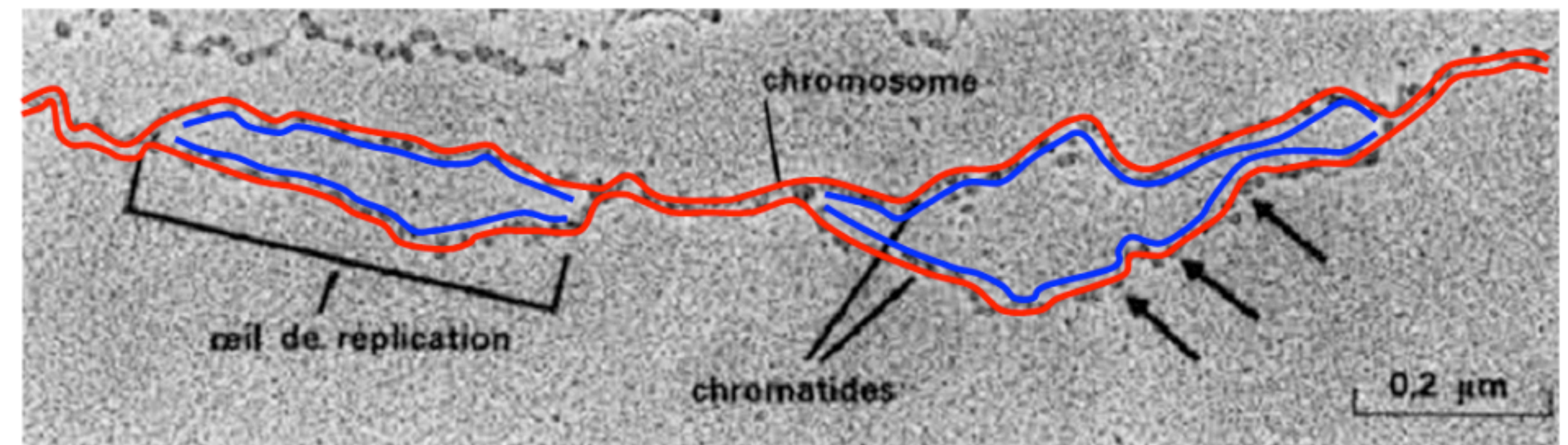
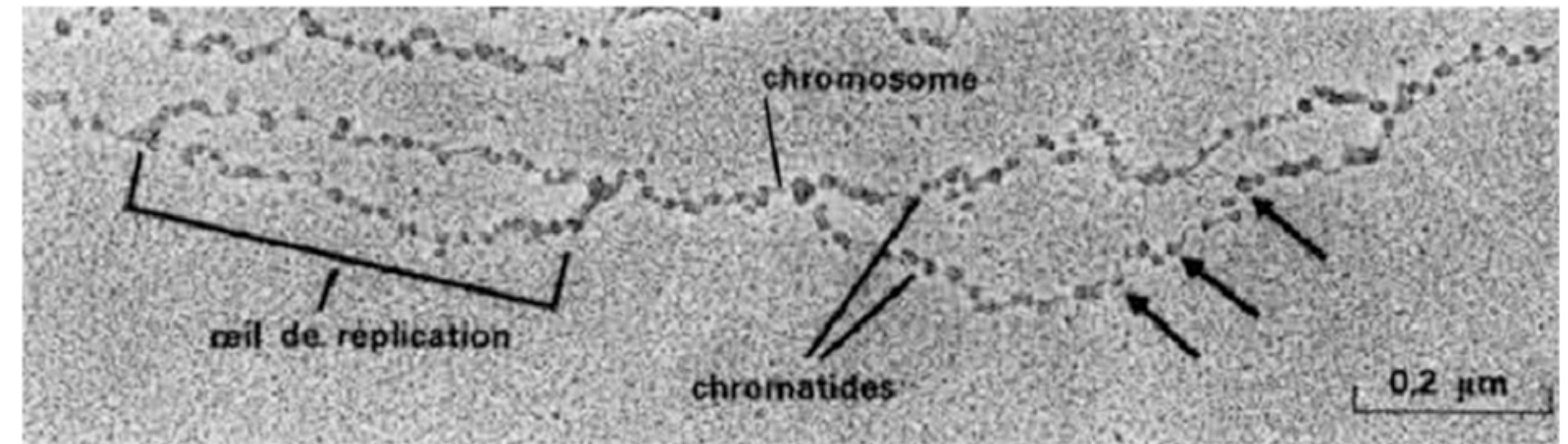
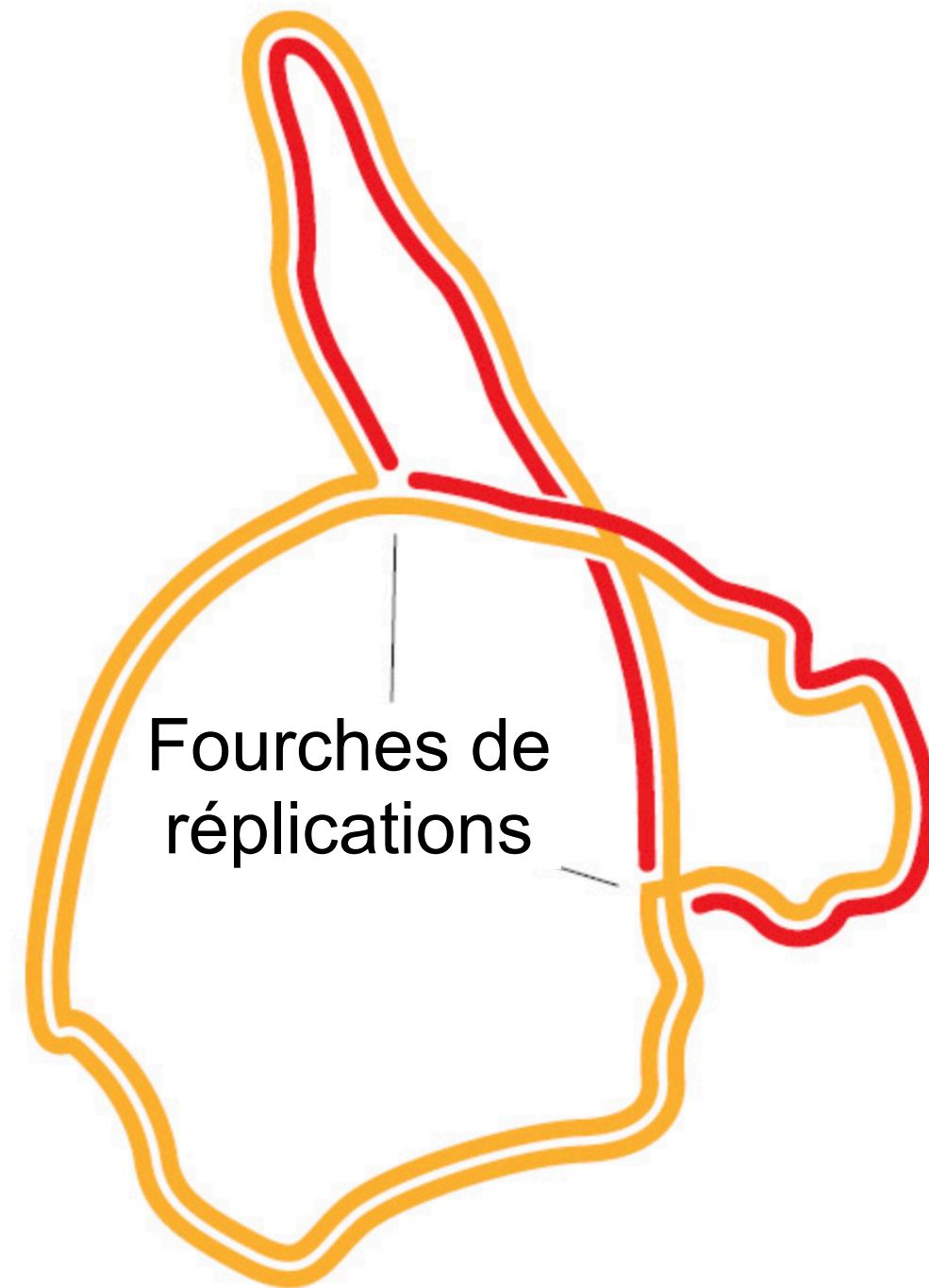
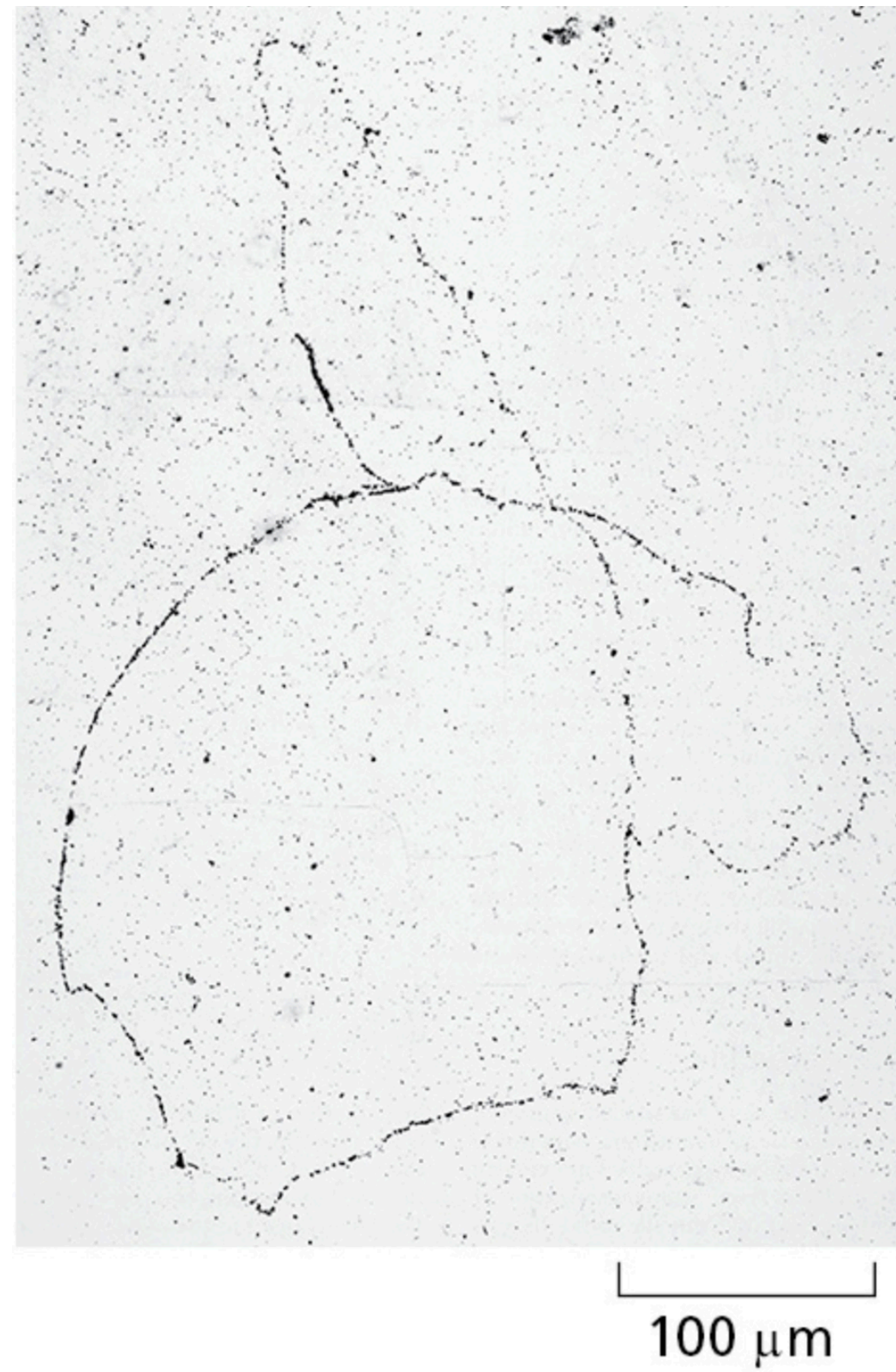
7- La fidélité lors de la réplication

8- Le problème topologique

9- Les télomères

10- Applications

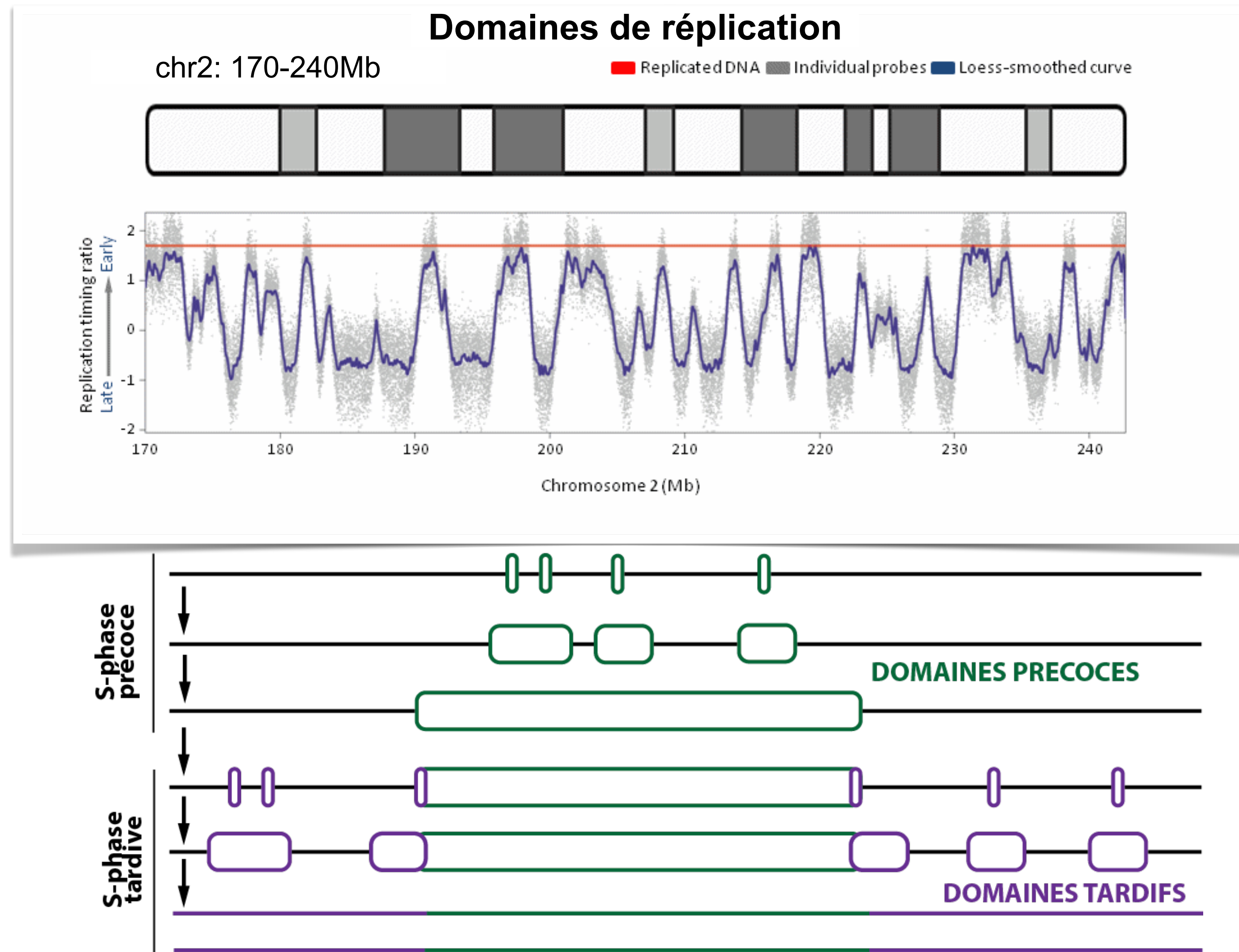
Yeux, fourches et domaines de réplication



Adapté de Molecular Biology of the Cell, 7th edition

<http://raymond.rodriquez1.free.fr/Documents/Cellule-genome/replication3.png>

Yeux, fourches et domaines de réplication





<https://web.speakup.info/room/join/66591>

QUIZZ: en combien de temps une cellule humaine réplique-t-elle son génome?

- 1- 10 minutes
- 2- 60 minutes
- 3- 2 heures
- 4- 8 heures
- 5- 24 heures

Réplication de l'ADN

1- La réplication semi-conservative

2- Yeux, fourches et domaines de rélications

3- Le "mix" réplicatif

4- Synthèse de l'ADN

5- Initiation de la réplication

6- Elongation de la réplication

7- La fidélité lors de la réplication

8- Le problème topologique

9- Les télomères

10- Applications

Mécanismes généraux: le "mix" répliatif

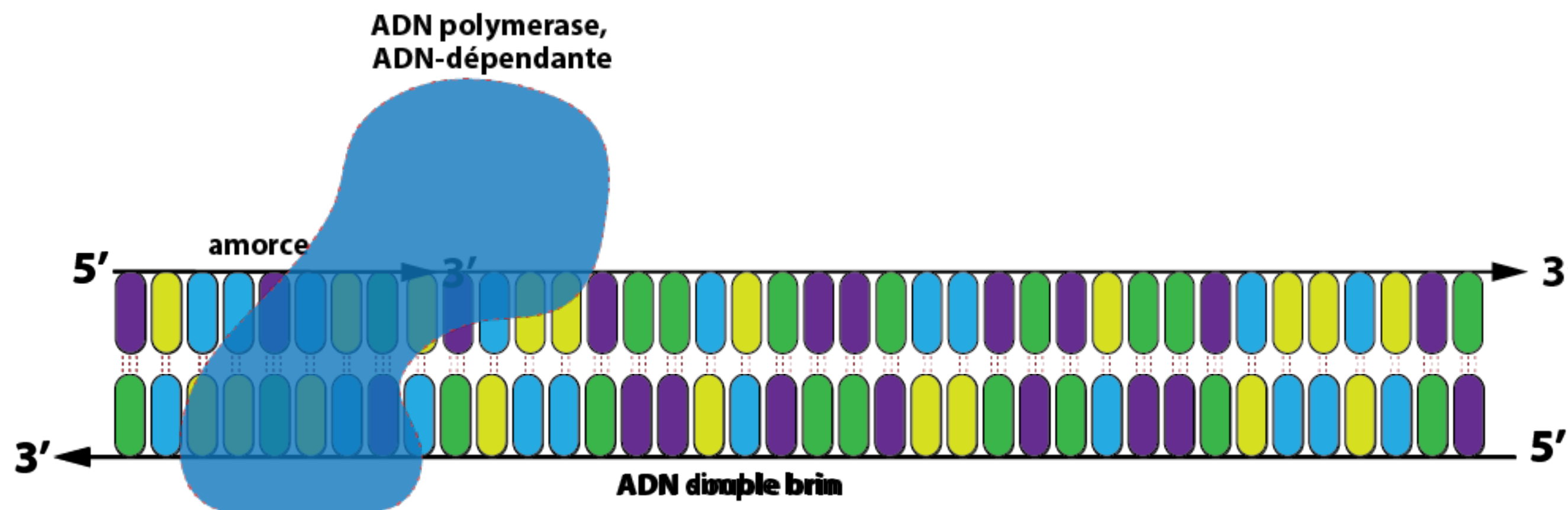
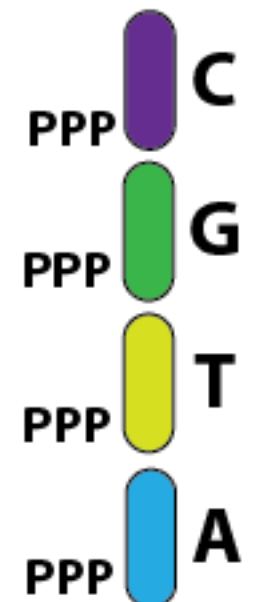
1. De l'**ADN**: simple brin

2. **Nucleosides** triphosphates (pppT, pppG, pppA, pppC)

3. Une **amorce** (primer)

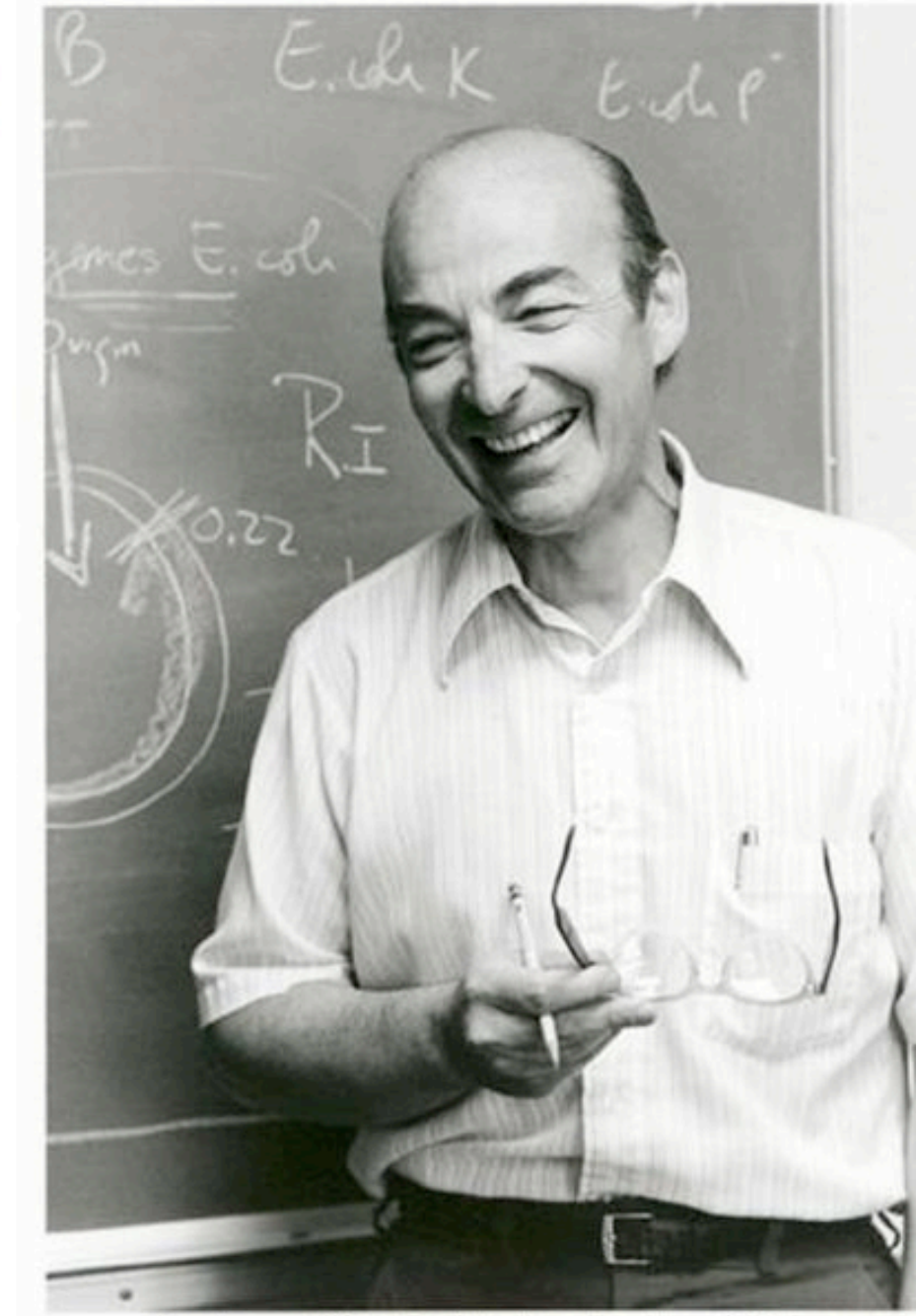
4. Une enzyme: isolation en fractionnant des bactéries: ici une **ADN polymerase**, ADN-dépendante

nucléosides triphosphates



Discovery of DNA polymerase

Arthur Kornberg is credited with the discovery of DNA polymerase— using *E. coli* as a model system



Courtesy of Stanford University, News Office. Noncommercial, educational use only.

Réplication de l'ADN

1- La réplication semi-conservative

2- Yeux, fourches et domaines de rélications

3- Le "mix" réplicatif

4- Synthèse de l'ADN

5- Initiation de la réplication

6- Elongation de la réplication

7- La fidélité lors de la réplication

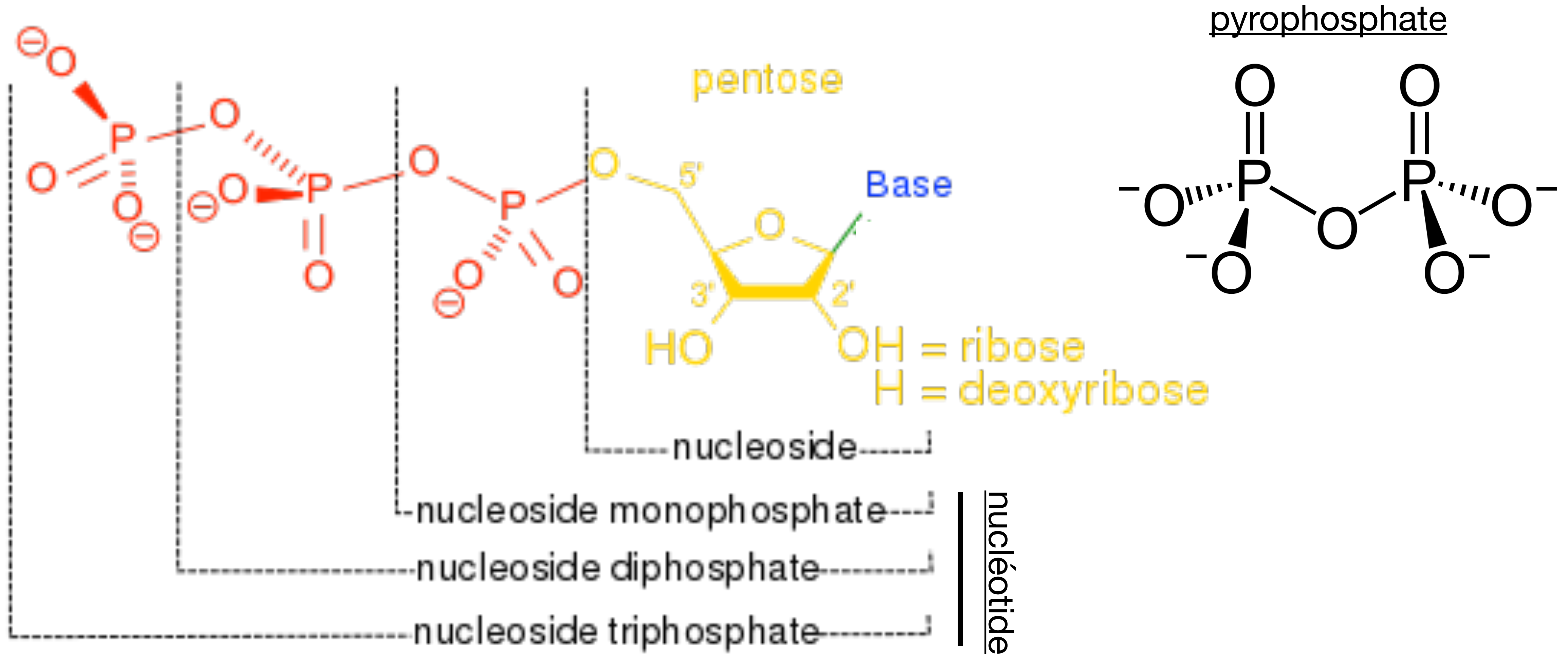
8- Le problème topologique

9- Les télomères

10- Applications

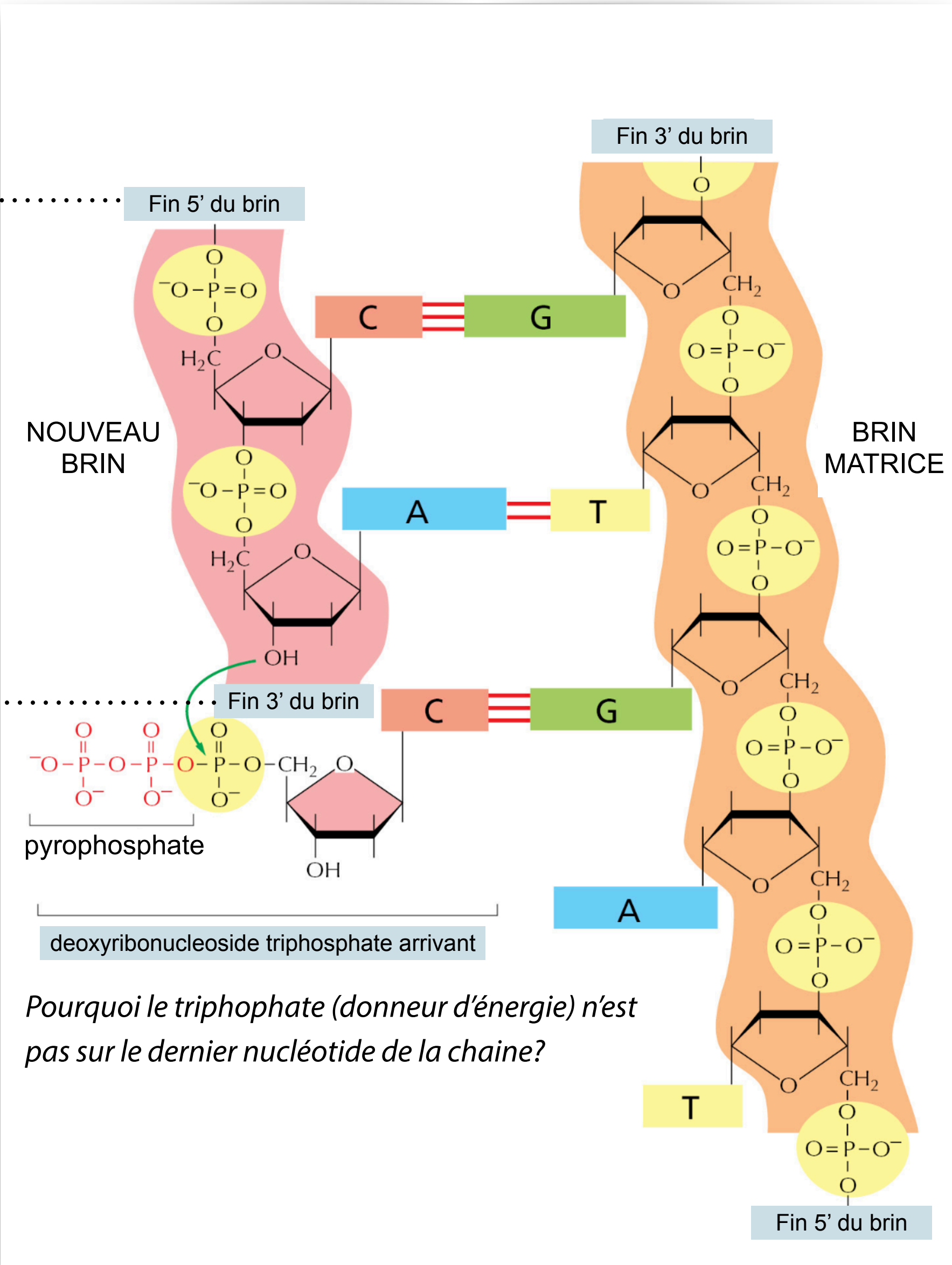
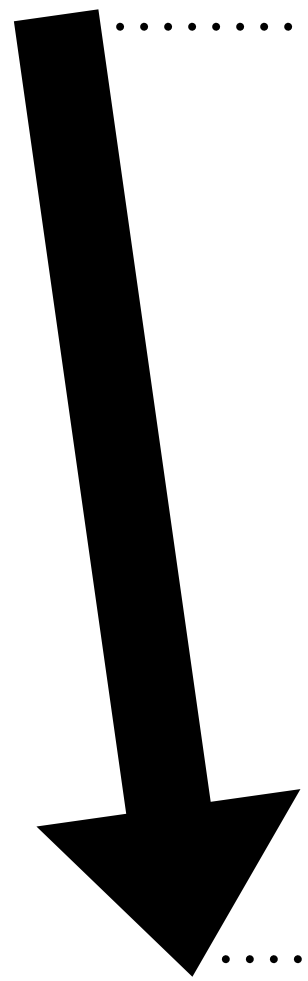
Synthèse de l'ADN

Le groupe phosphate des nucléotides (au contraire des nucléosides, qui n'en ont pas)

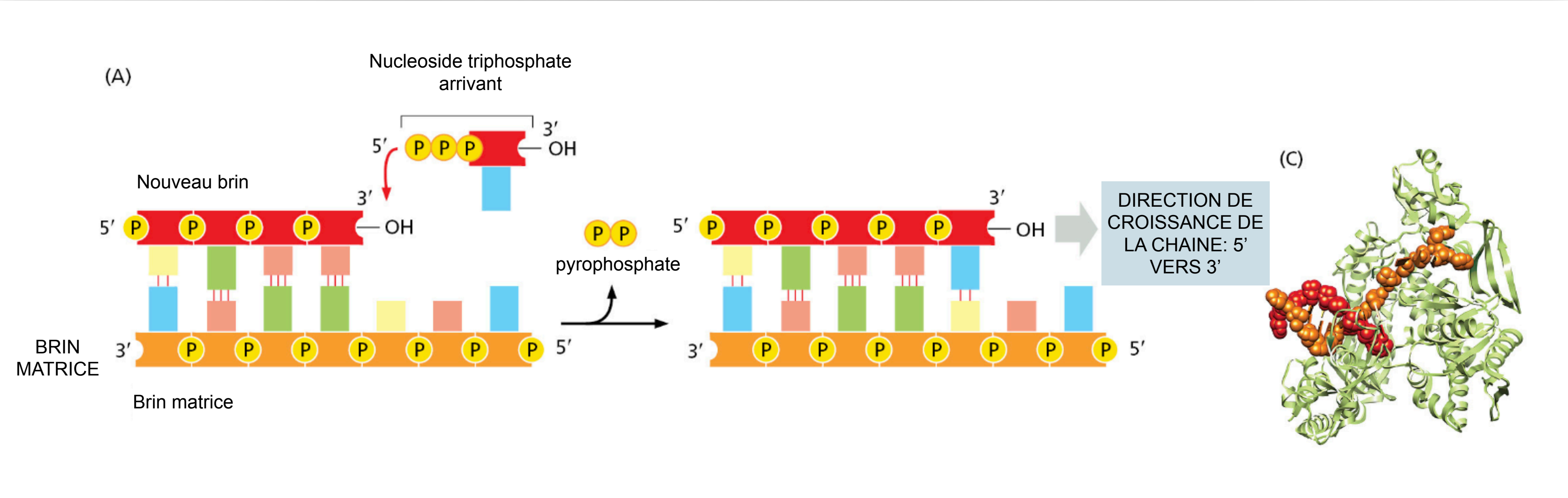


Synthèse de l'ADN

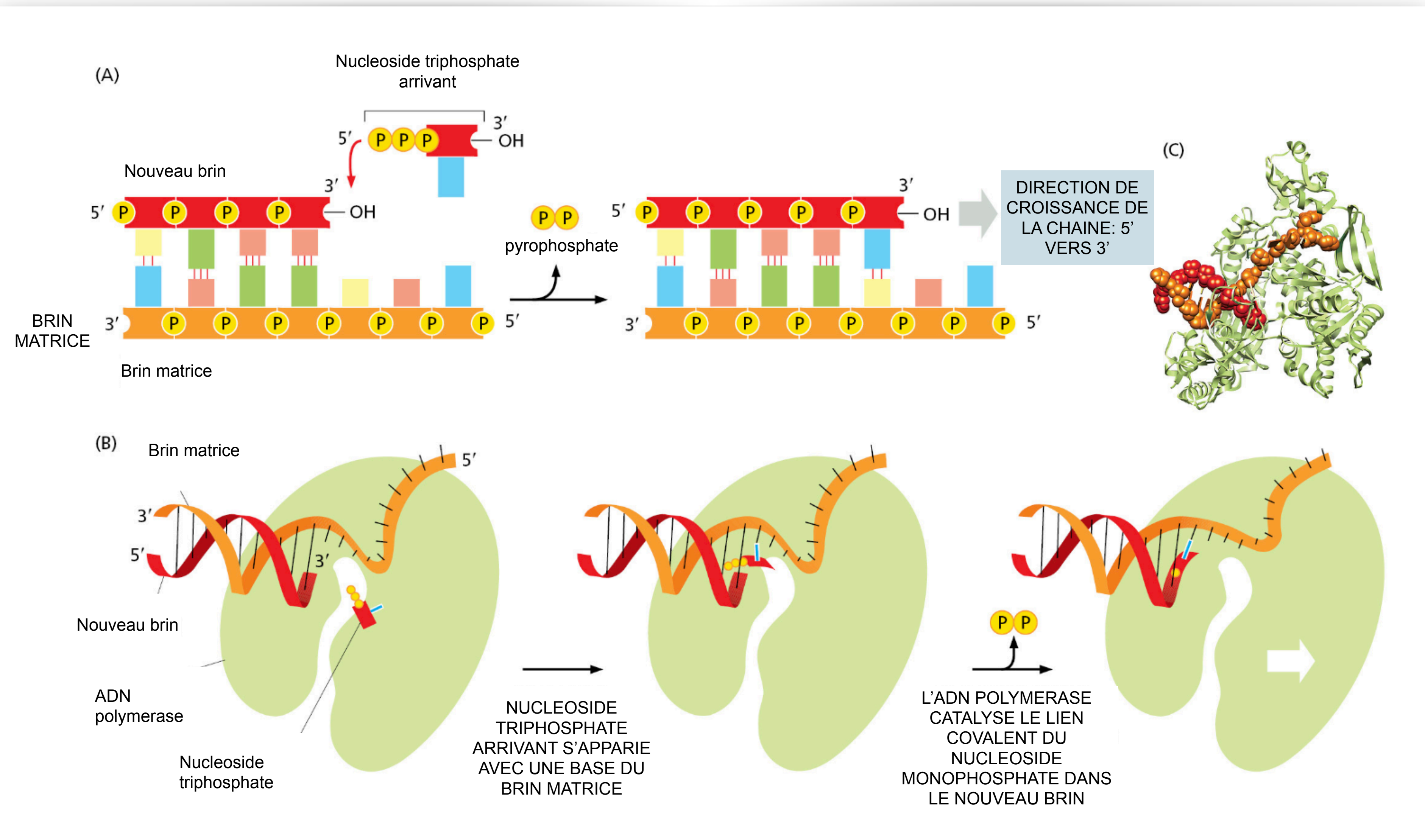
La polymerisation est directionnelle!
Toujours de 5' en 3'



Synthèse de l'ADN



Synthèse de l'ADN



Mécanismes généraux: le "mix" réplcatif

1. De l'**ADN**: simple brin

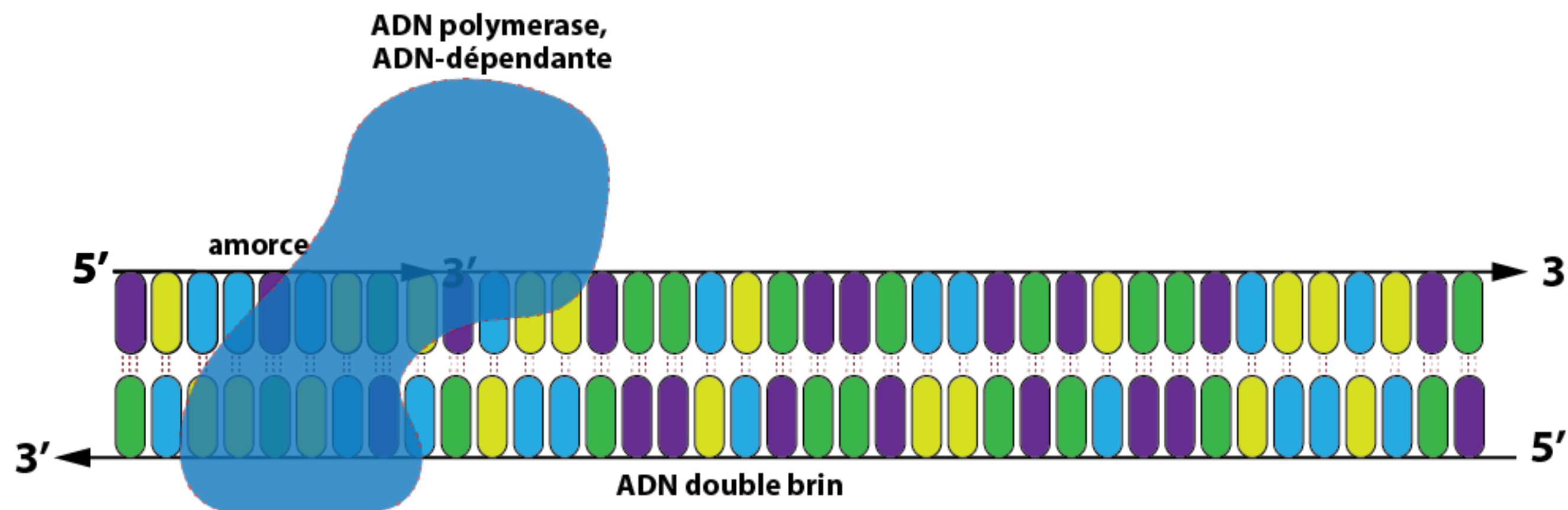
Relativement facile à produire chimiquement, mais comment cela est fait dans la cellule?

2. **Nucléosides** triphosphates (pppT, pppG, pppA, pppC)

3. Une **amorce** (primer)

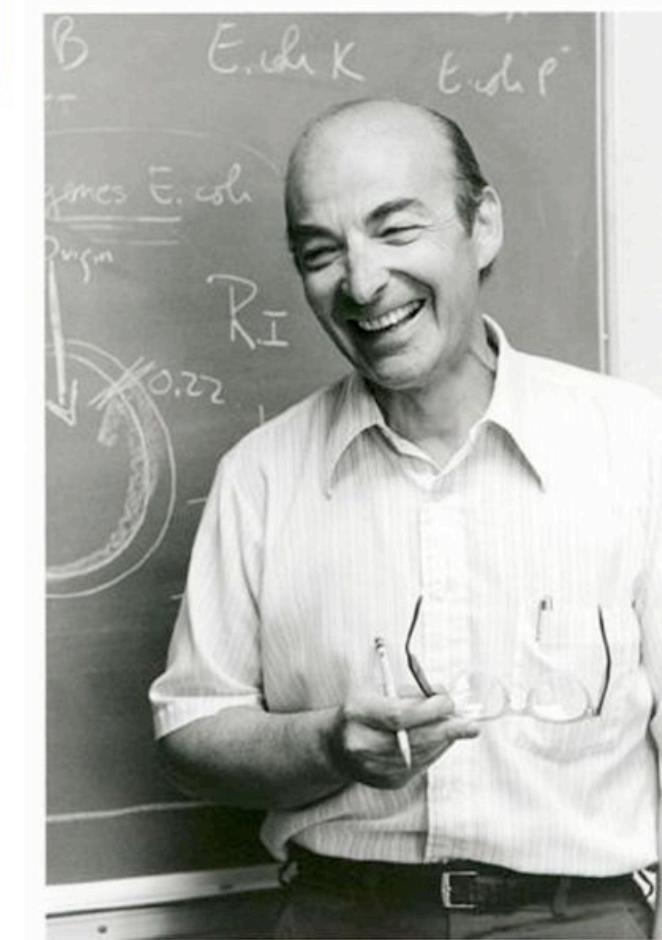
4. Une enzyme: isolation en fractionnant des bactéries: ici une **ADN polymerase**, ADN-dépendante

nucléosides triphosphates

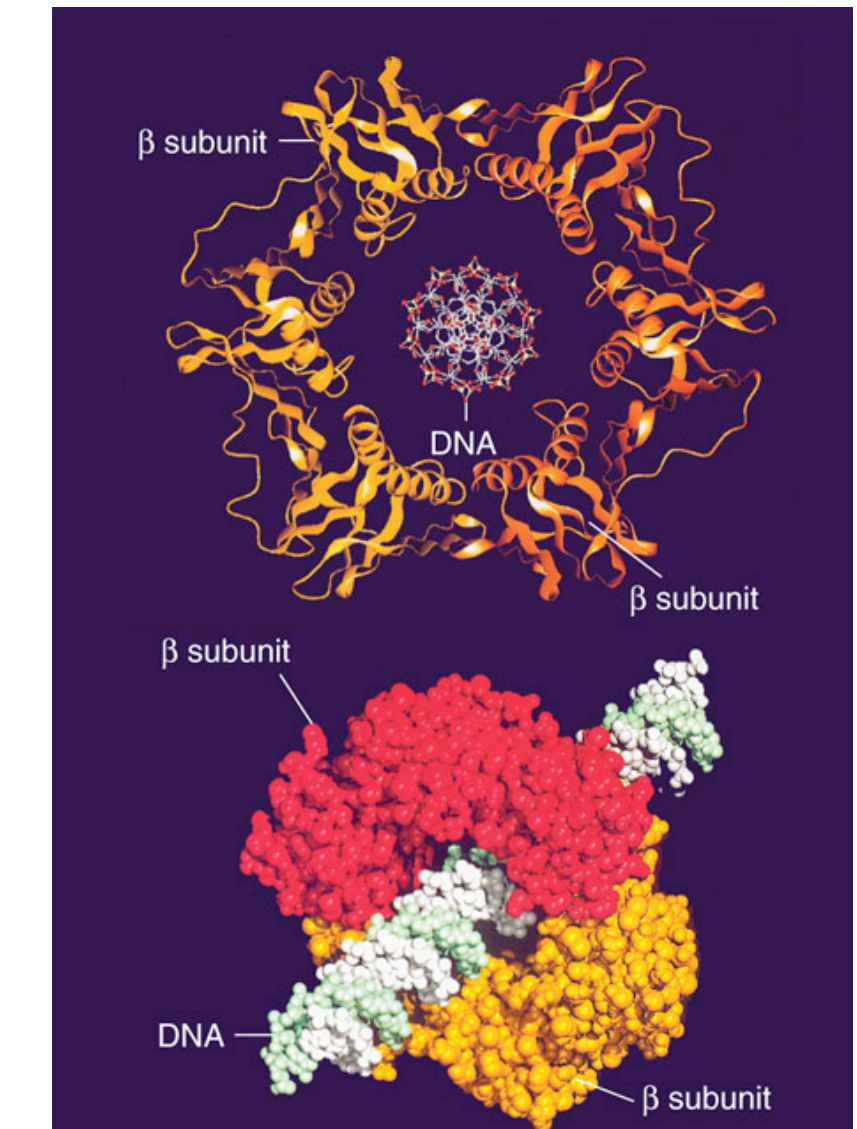


Discovery of DNA polymerase

Arthur Kornberg is credited with the discovery of DNA polymerase— using *E. coli* as a model system

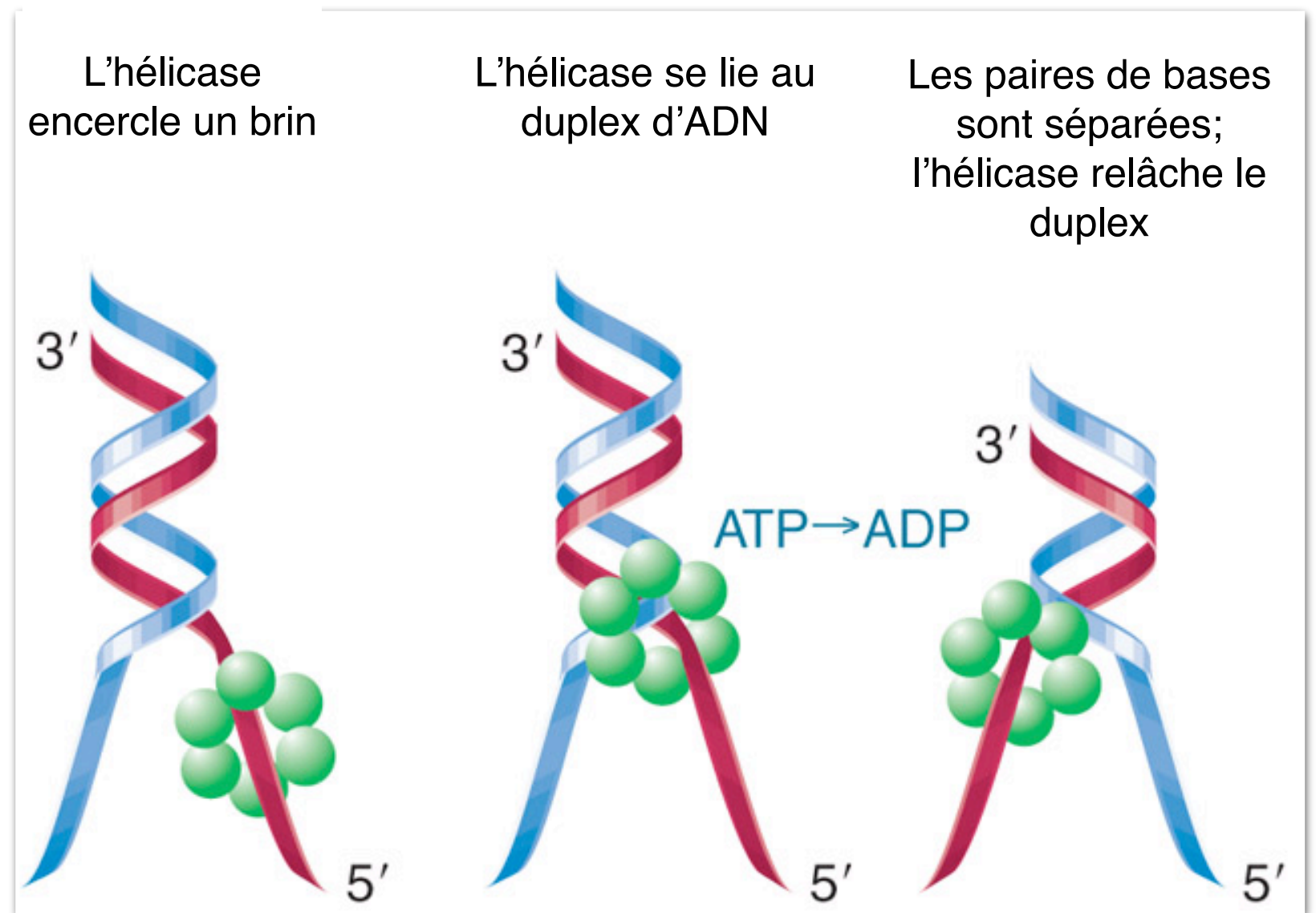


La polIII: deux sous unités

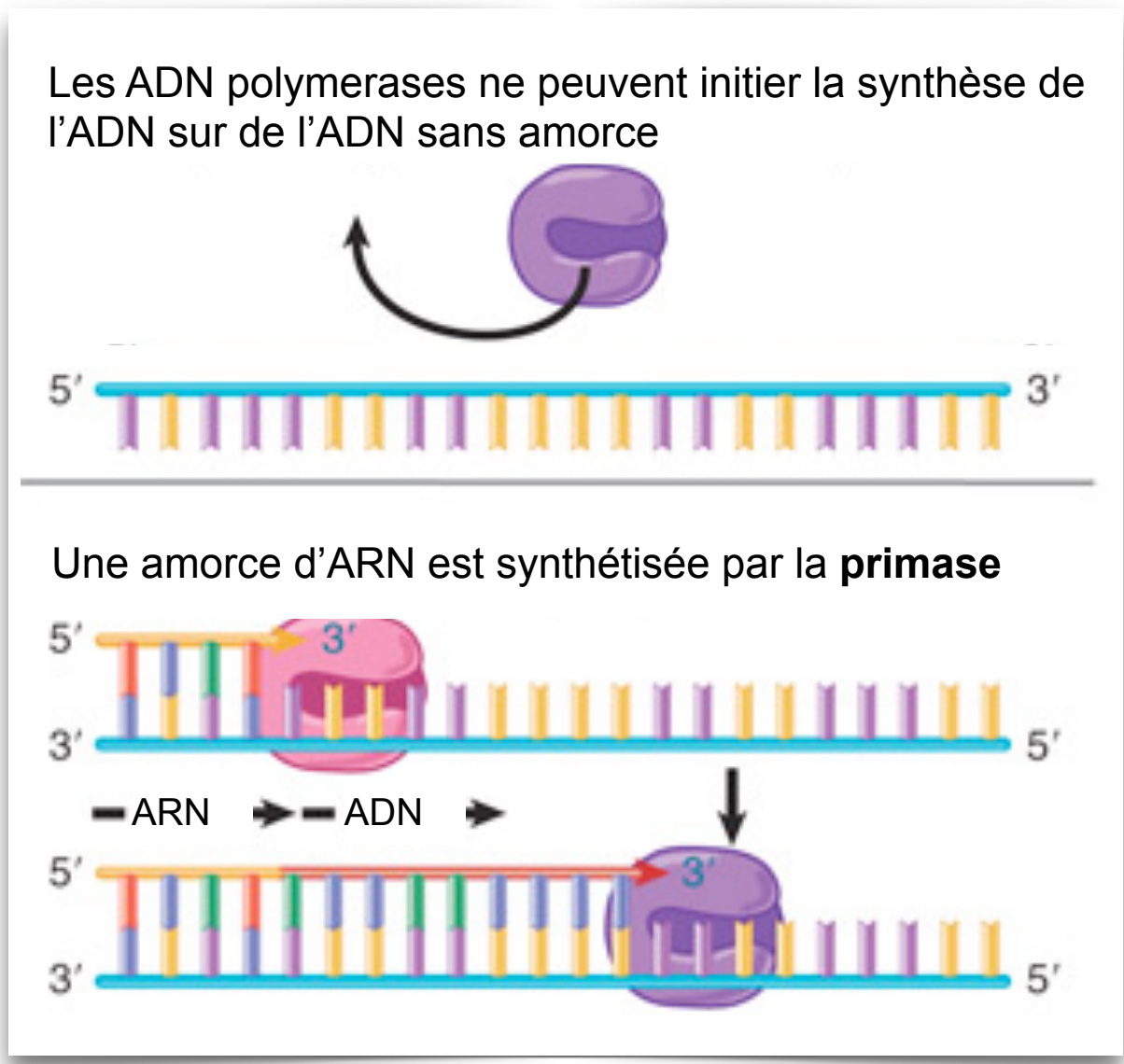


Synthèse de l'ADN

Obtention d'ADN simple brin



Production de l'amorce



Réplication de l'ADN

1- La réplication semi-conservative

2- Yeux, fourches et domaines de rélications

3- Le "mix" réplicatif

4- Synthèse de l'ADN

5- Initiation de la réplication

6- Elongation de la réplication

7- La fidélité lors de la réplication

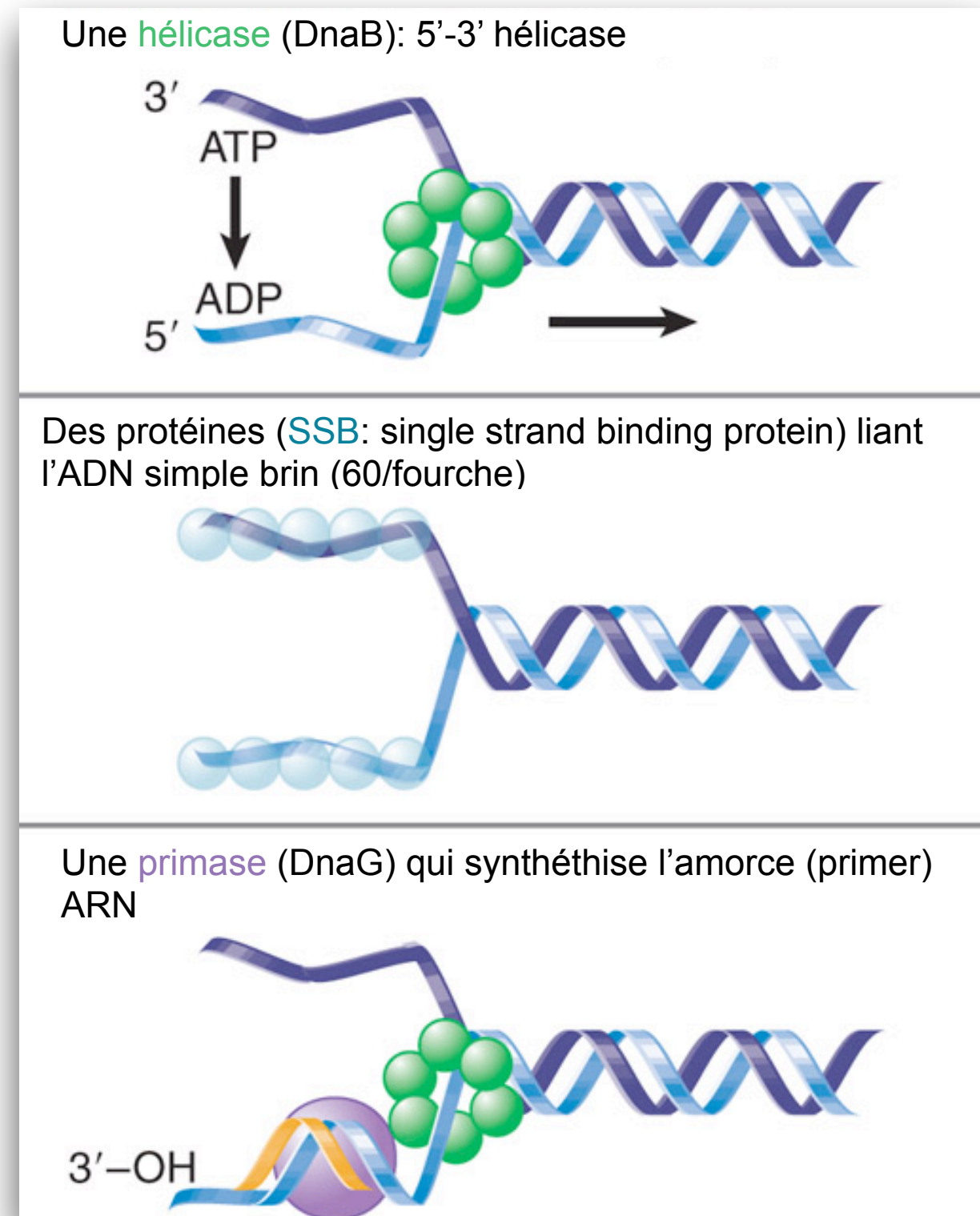
8- Le problème topologique

9- Les télomères

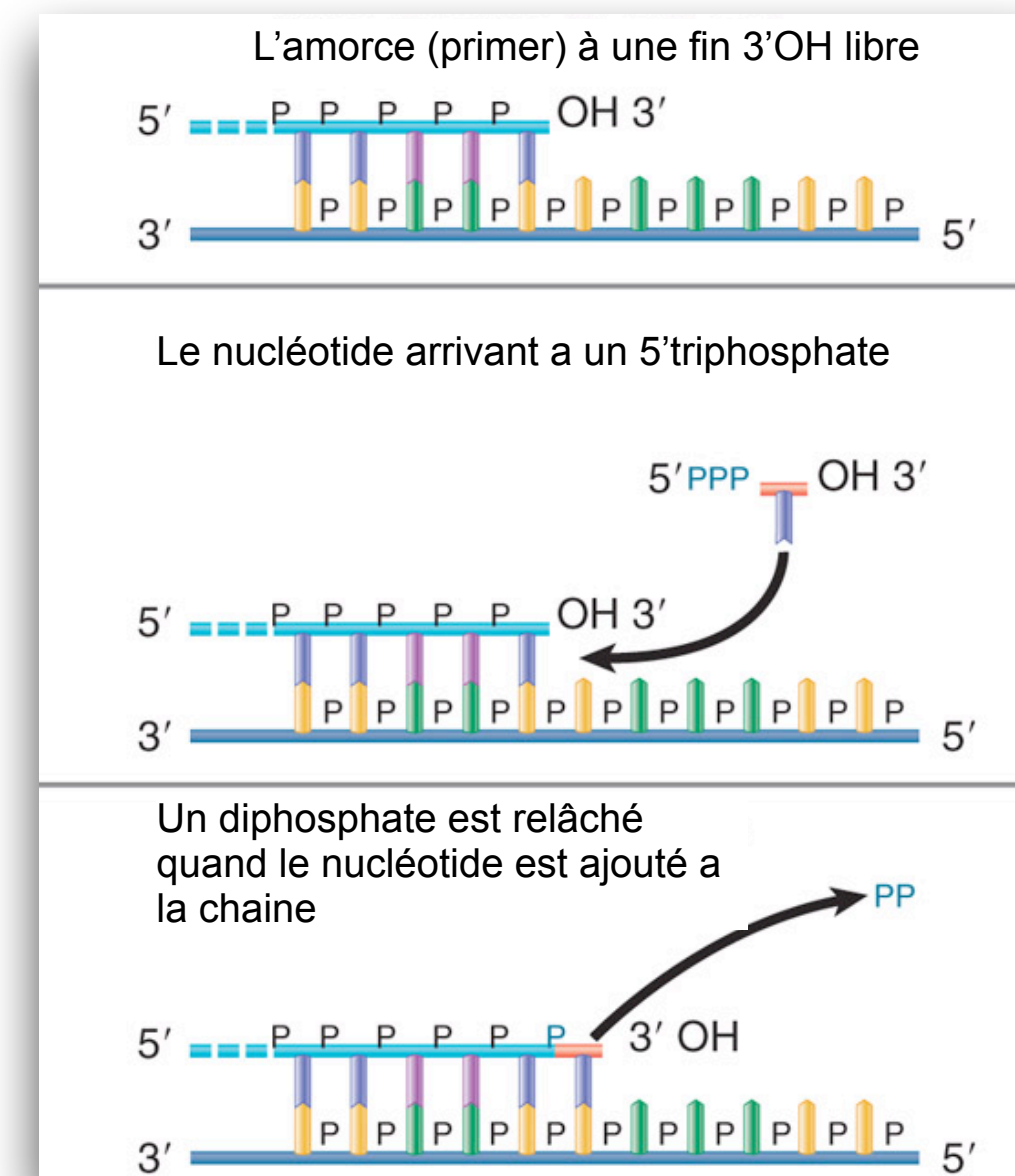
10- Applications

Initiation de la réplication

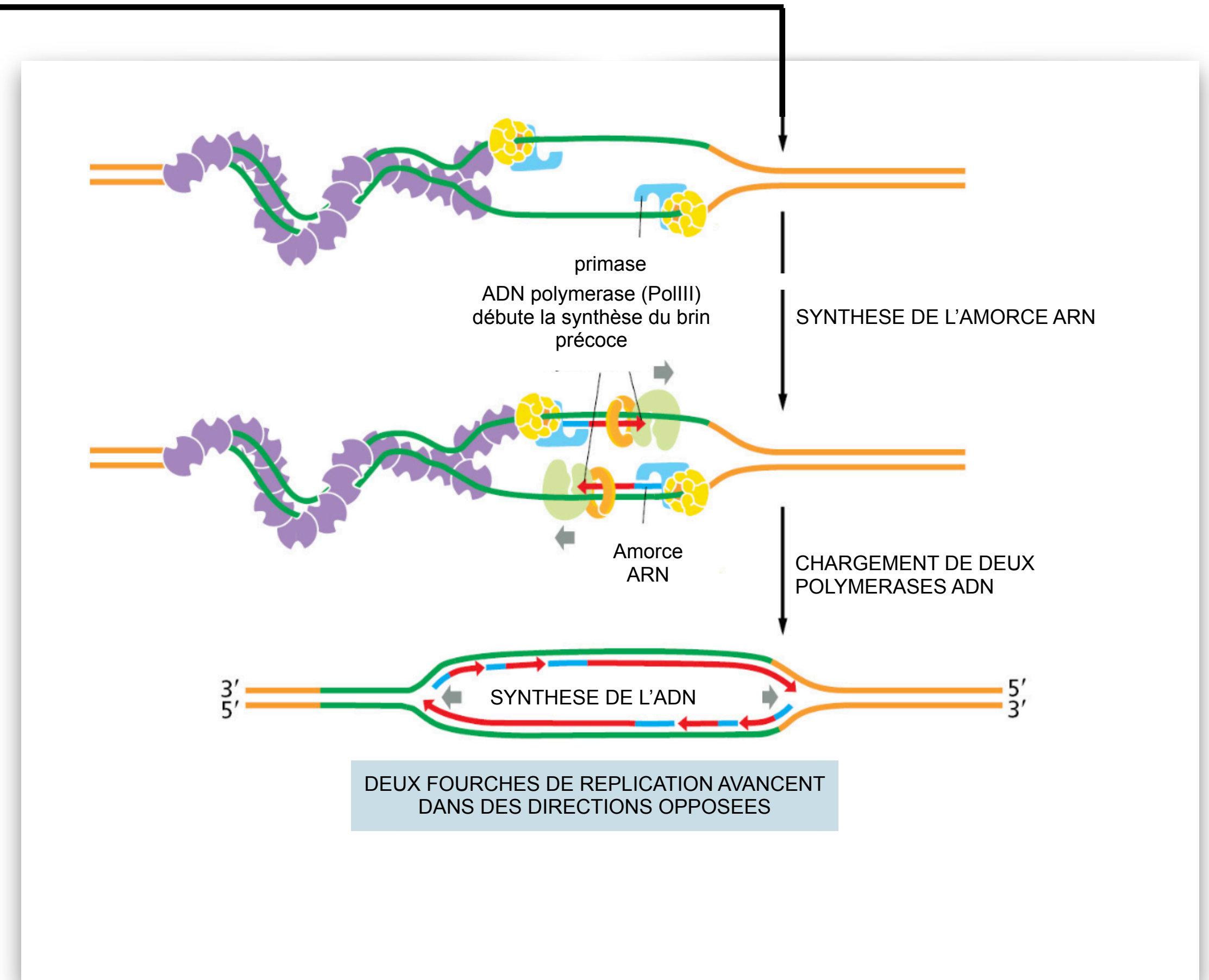
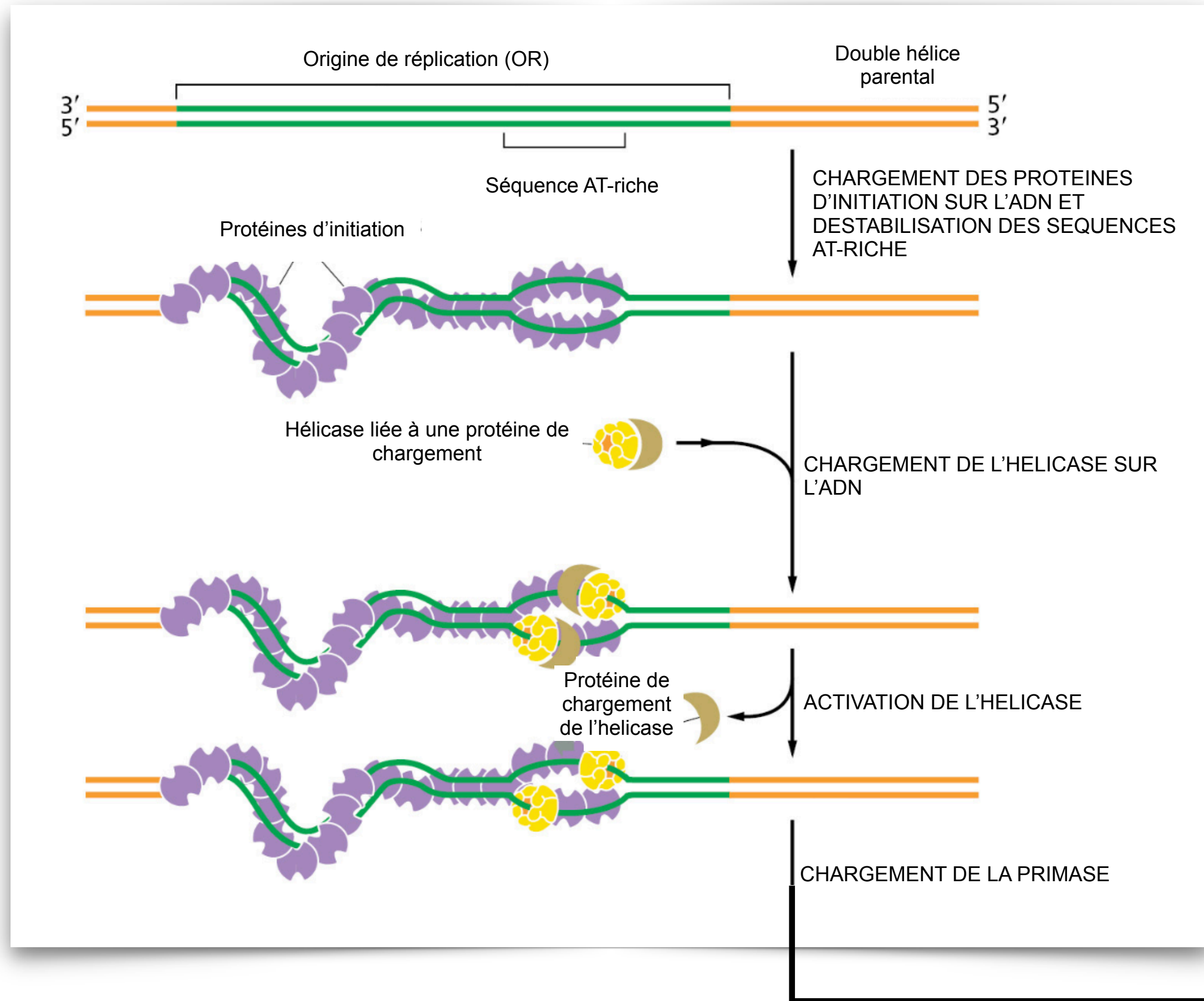
Initiation et activité enzymatique



Démarrage de la polymérisation



Initiation de la réplication



Initiation de la réplication

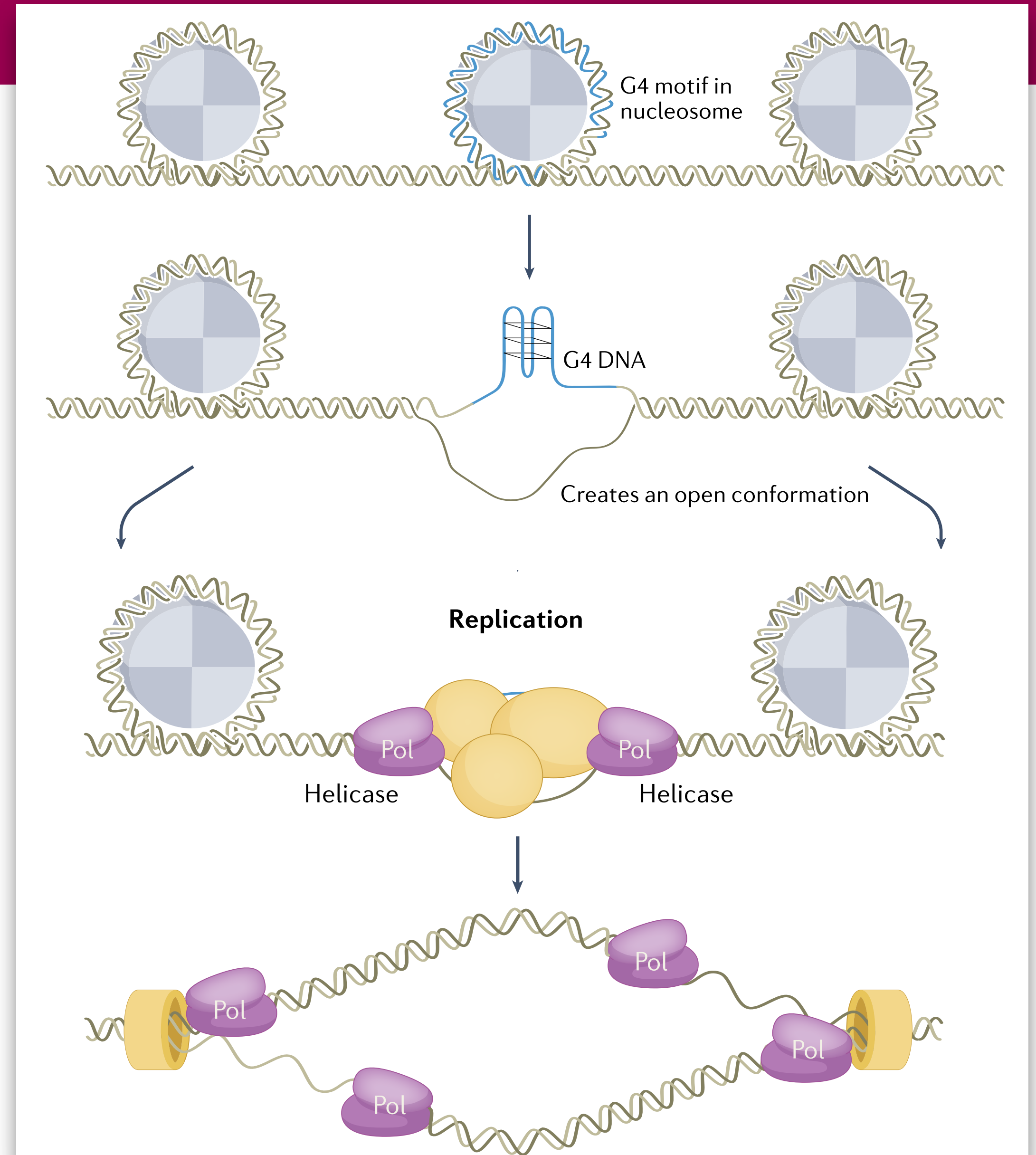
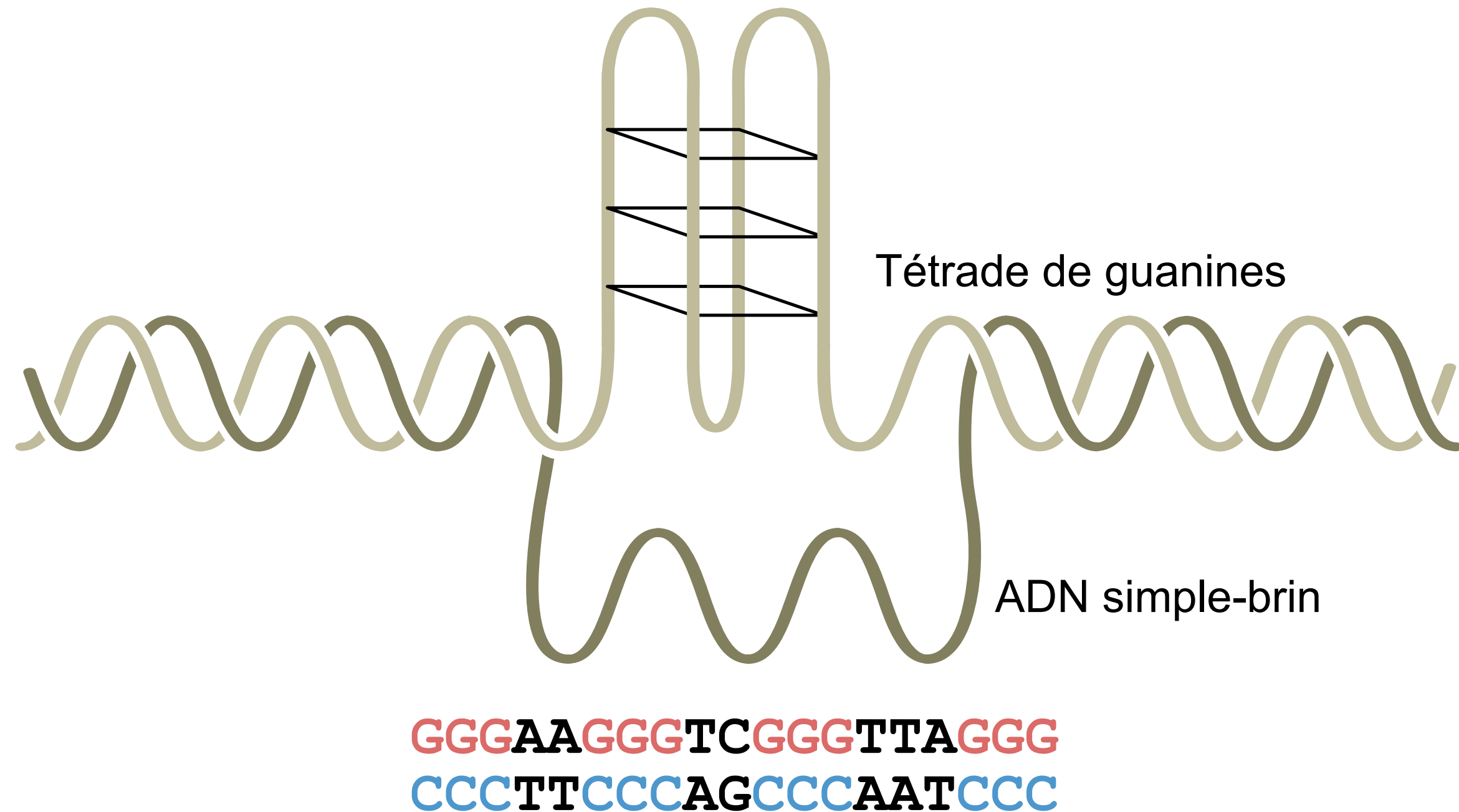
Dans quelles régions du génome?

Tres fréquemment des séquences riches en AT

Alternativement:

- Certaines formes d'ADN non canoniques (non "B")
- Une possibilité: les "G quadruplex"
- Cette forme, en particulier, rend plus difficile la déposition d'histones

Tétrade de guanine: séquences contenant quatre suites de trois guanines ou plus.



Réplication de l'ADN

1- La réplication semi-conservative

2- Yeux, fourches et domaines de rélications

3- Le "mix" réplicatif

4- Synthèse de l'ADN

5- Initiation de la réplication

6- Elongation de la réplication

7- La fidélité lors de la réplication

8- Le problème topologique

9- Les télomères

10- Applications



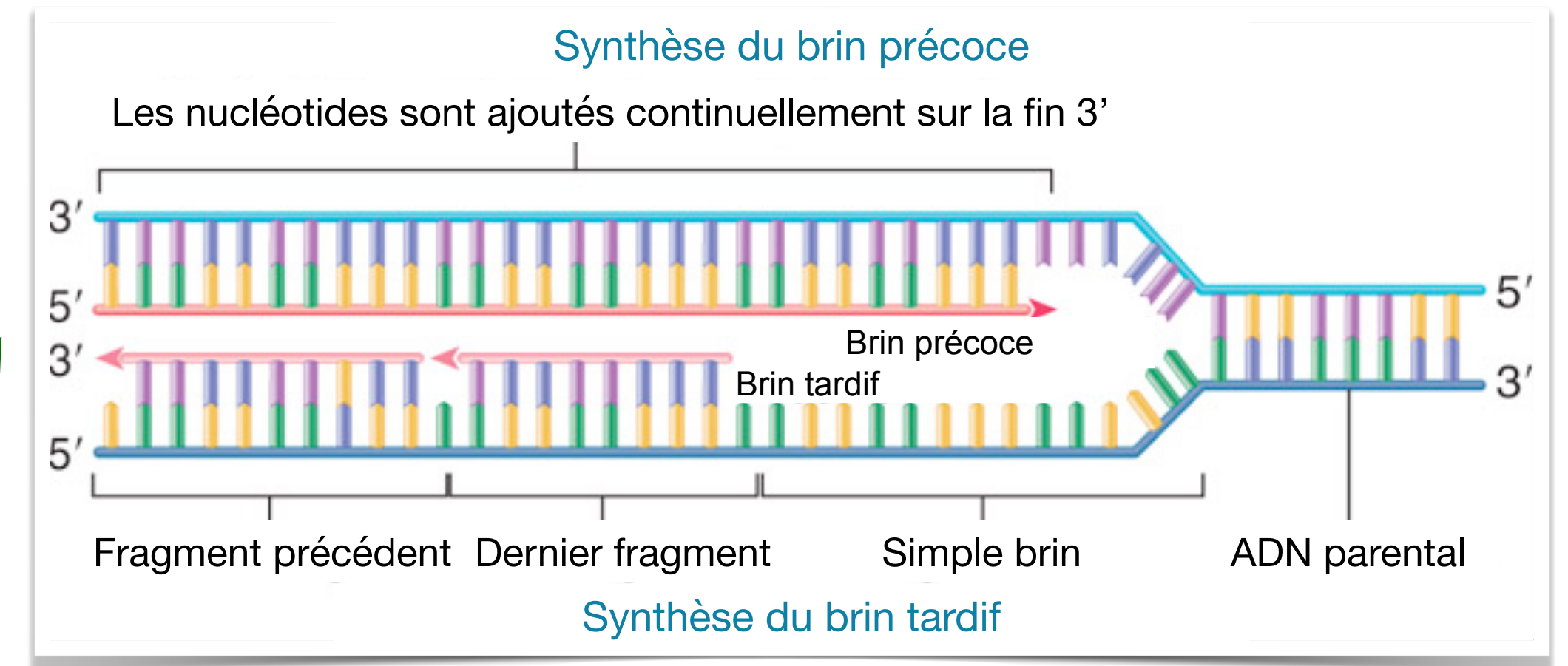
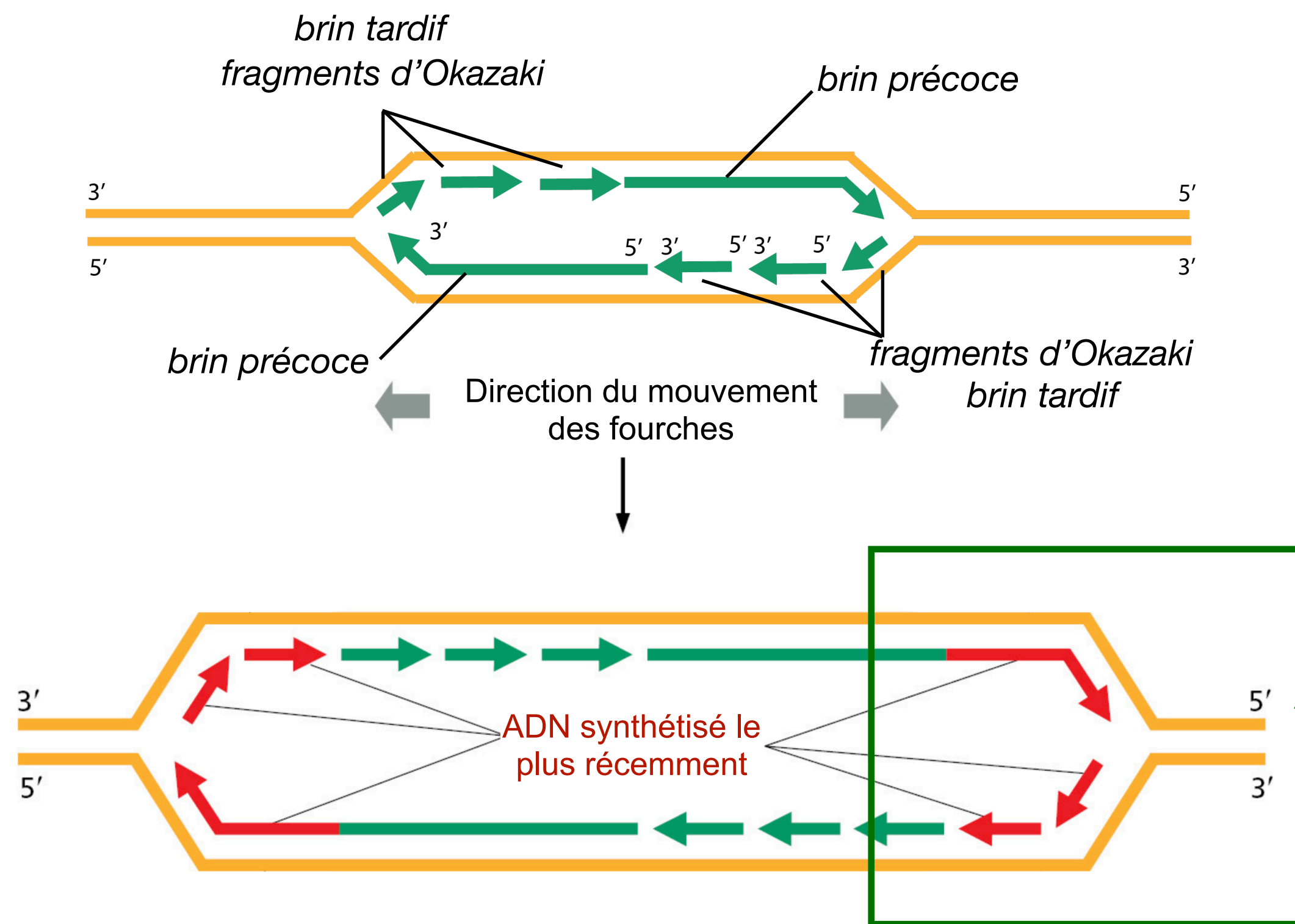
<https://web.speakup.info/room/join/66591>

QUIZZ: quelle est la vitesse maximale d'une polymerase?

- 1- 1 nucléotide par seconde (n/s)
- 2- 10 n/s
- 3- 120 n/s
- 4- 240 n/s
- 5- 1000 n/s

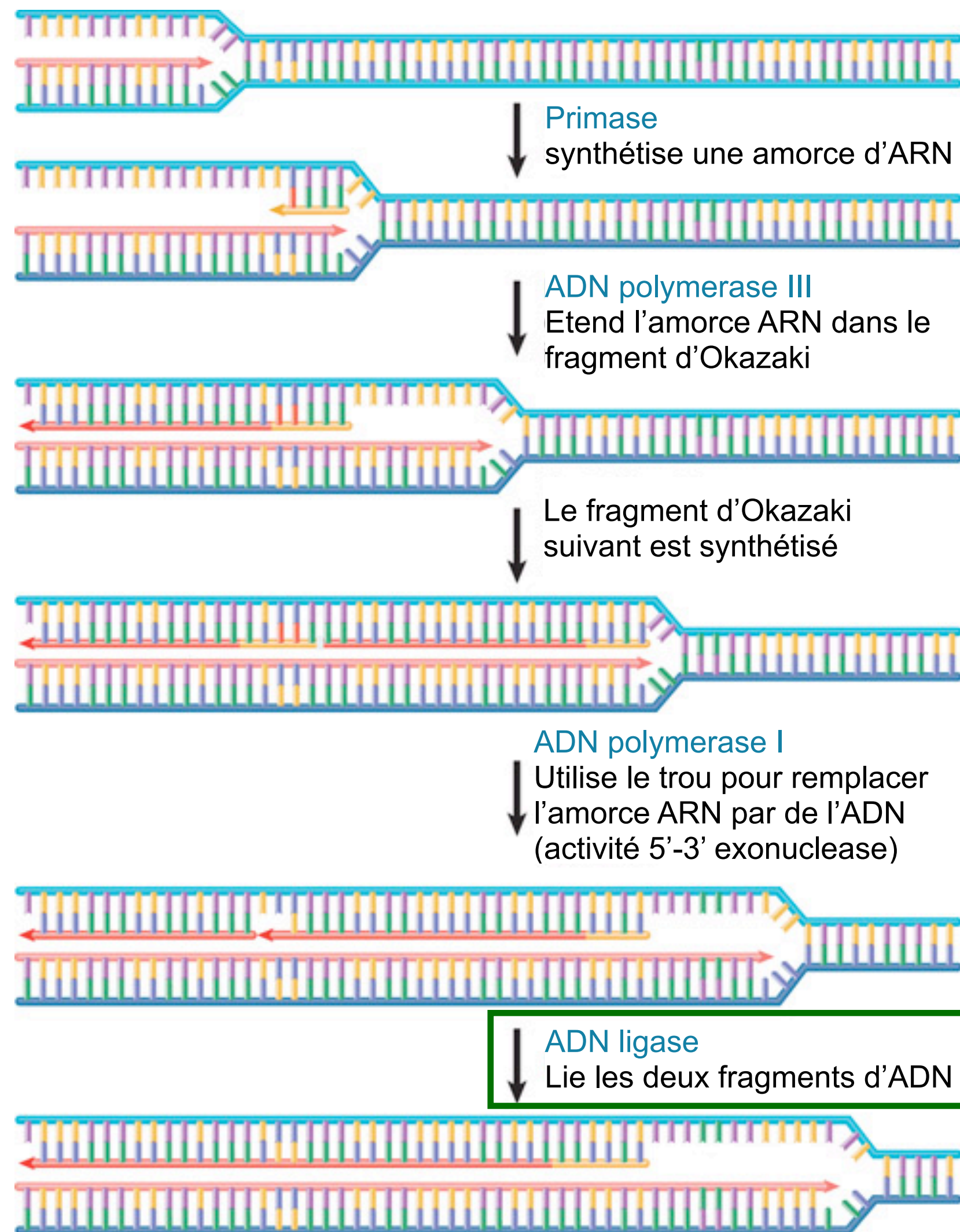
Elongation de la réplication

Du fait de la direction 5'-3' de la polymérisation une partie de la réplication, celle du brin tardif, doit se faire dans le sens contraire de l'avancement de la fourche, par des petit fragments

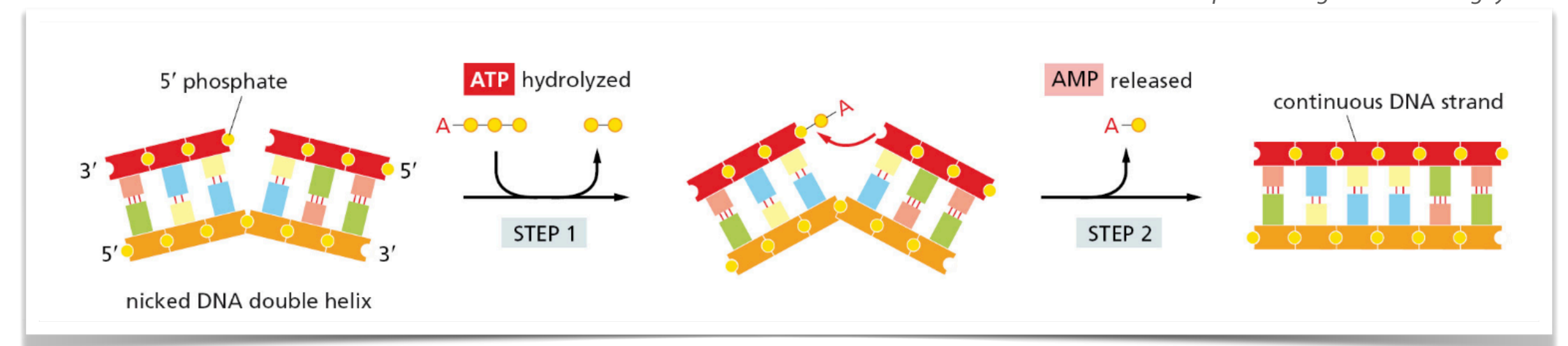


Tout les actions enzymatiques se produisent en continu, il n'y a quasiment pas d'ADN simple brin, et le peu qu'il y a est couvert de protéines SSB

Elongation de la réplication



L'ADN ligase lie les fragments d'Okazaki

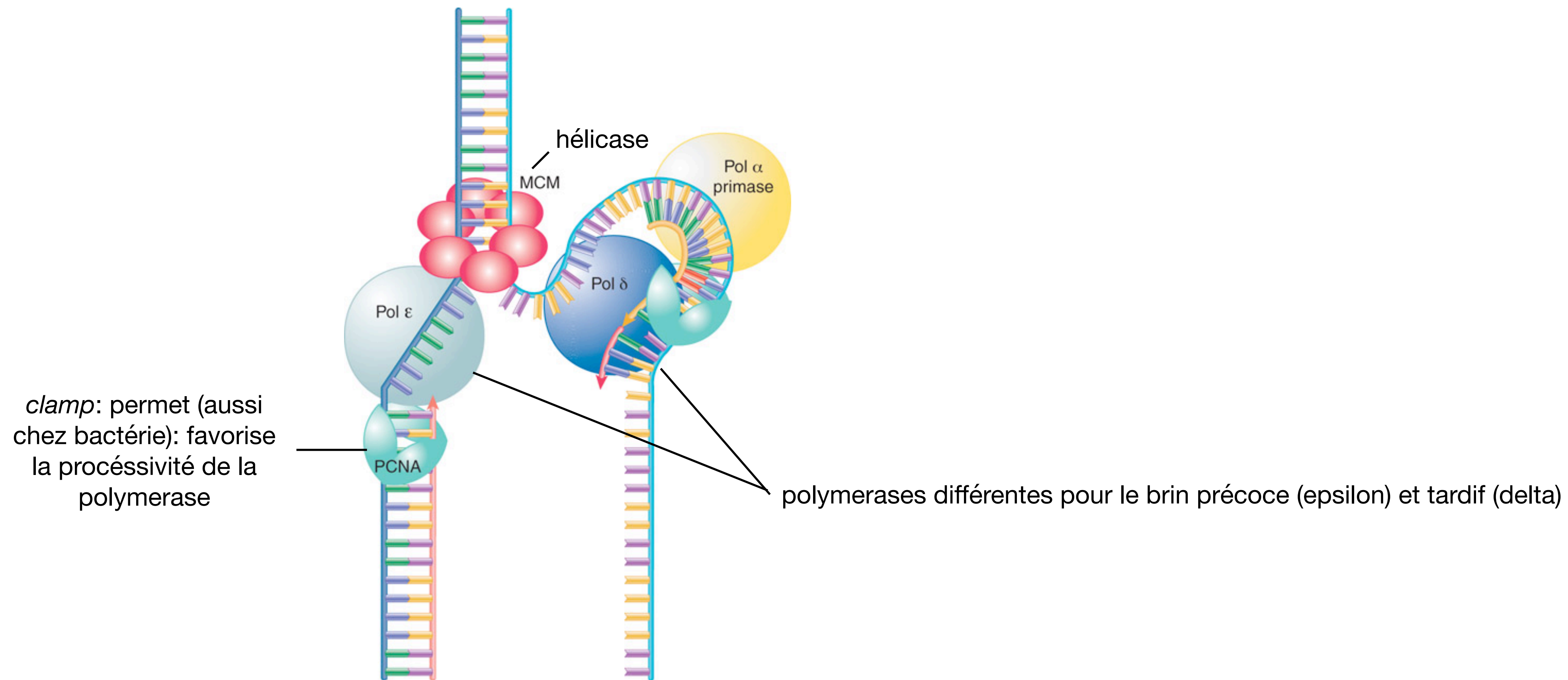


Réplication de l'ADN

PAUSE

Elongation de la réplication

Chez les eucaryotes, le système est très similaire



Réplication de l'ADN

1- La réplication semi-conservative

2- Yeux, fourches et domaines de rélications

3- Le "mix" réplicatif

4- Synthèse de l'ADN

5- Initiation de la réplication

6- Elongation de la réplication

7- La fidélité lors de la réplication

8- Le problème topologique

9- Les télomères

10- Applications

La fidélité de la réplication

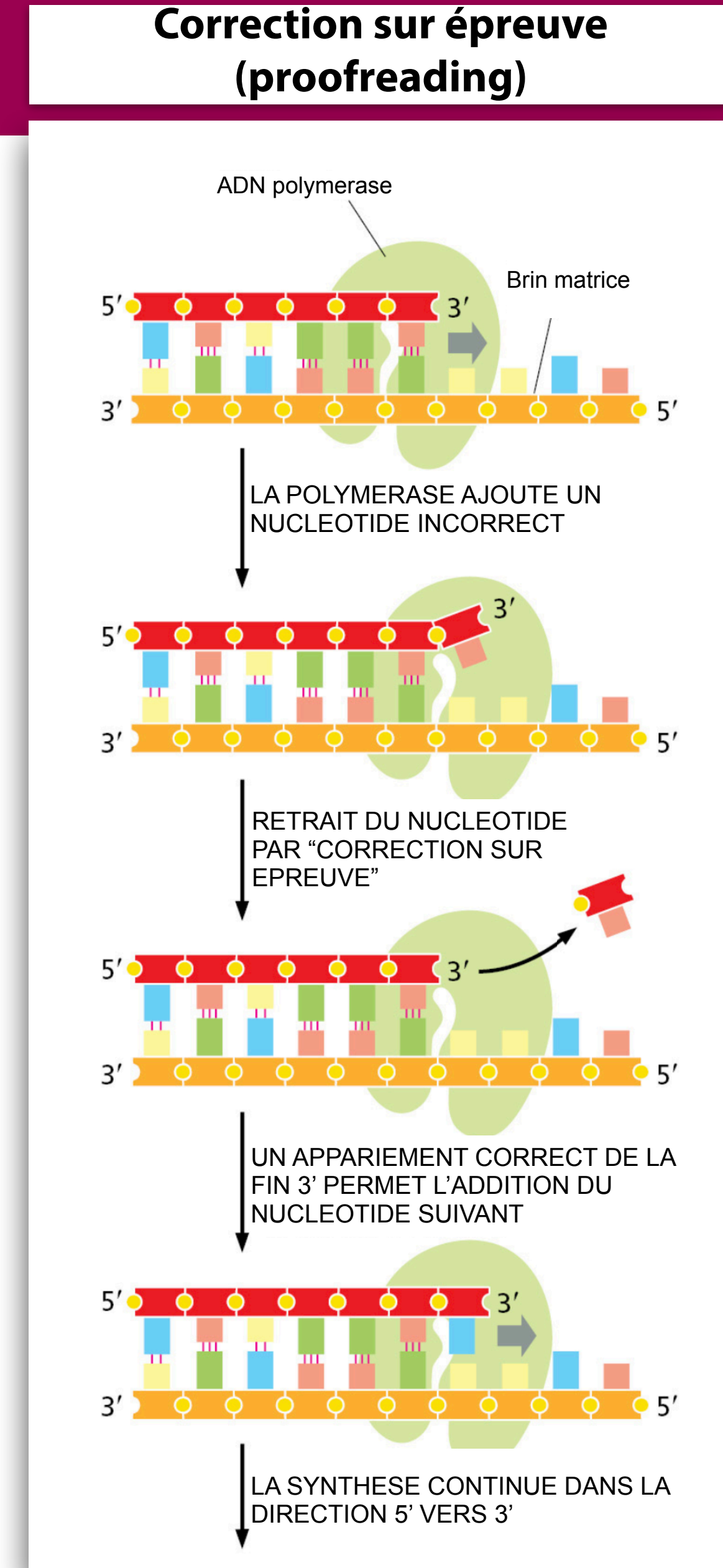
Les ponts hydrogène assurent en général que la bonne base rentre, mais une mauvaise base rentre toute les **10³** paires de bases (99.9% correct)

Est-ce suffisant?

Systèmes de correction rapide durant la réplication:

1- "correction sur épreuve (proofreading)"

- > L'ADN polymérase a une activité 5'-3' polymerase et **3'-5' exonucléase**
- > L'activité exonucléase enlève plus fréquemment une mauvaise base qu'une bonne
- > maintenant, une erreur toute les **10⁵-10⁶** paires de bases



La fidélité de la réplication

Les ponts hydrogène assurent en général que la bonne base rentre, mais une mauvaise base rentre toute les 10^3 paires de bases (99.9% correct)

Est-ce suffisant?

Systèmes de correction rapide durant la réplication:

1- “**correction sur épreuve** (proofreading)”

2- “**réparation des mésappariements** (mismatch)”

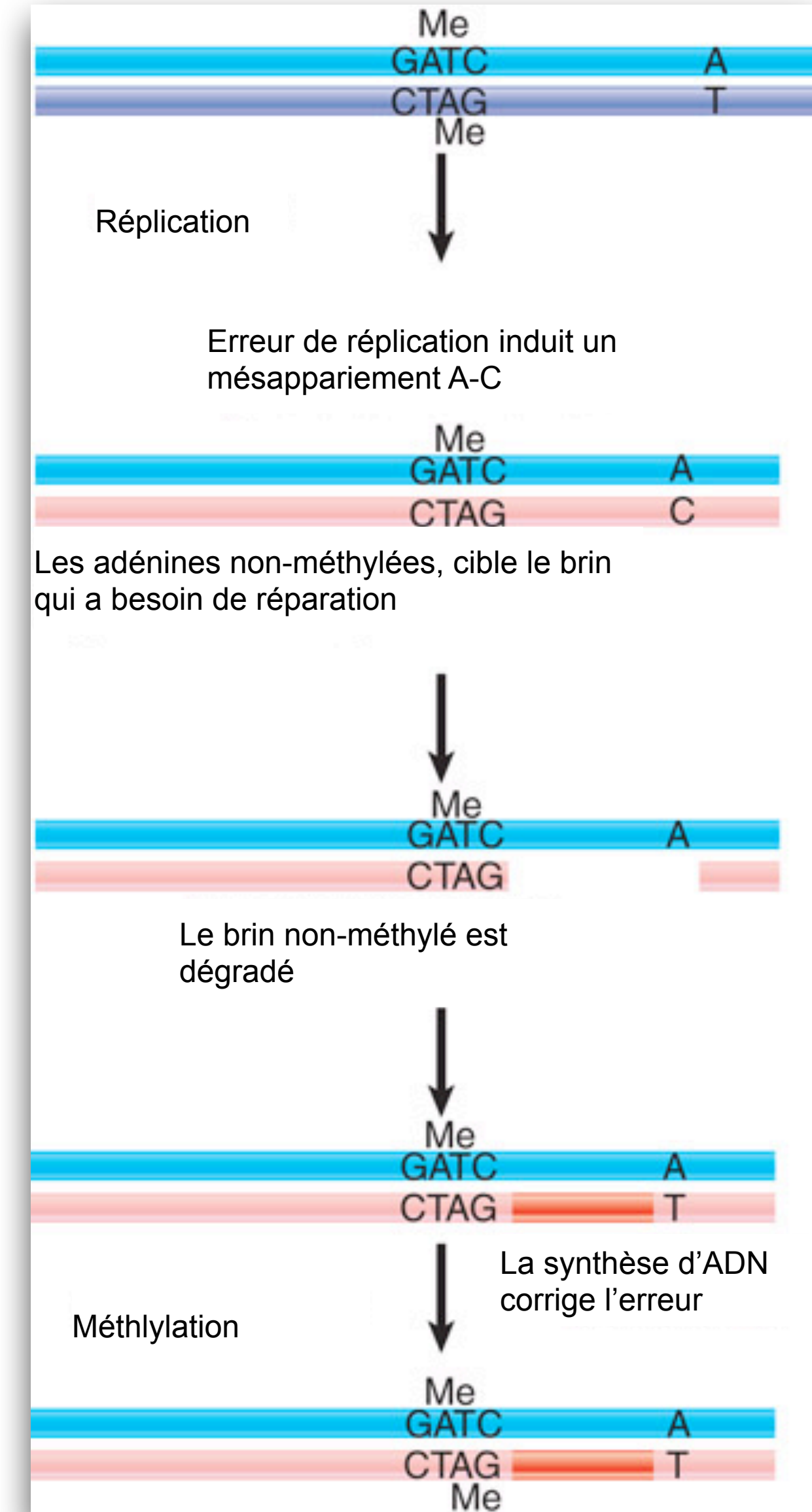
> Les protéines de réparations **coupent l'ADN, enlèvent et recopient**

> Un complexe de protéines **reconnait et lie les mésappariement** de l'ADN

> Utilisation de **methylation** pour déterminer le brin matrice (bactéries) comme référence de réparation

> maintenant une erreur toute les 10^9 paires de bases

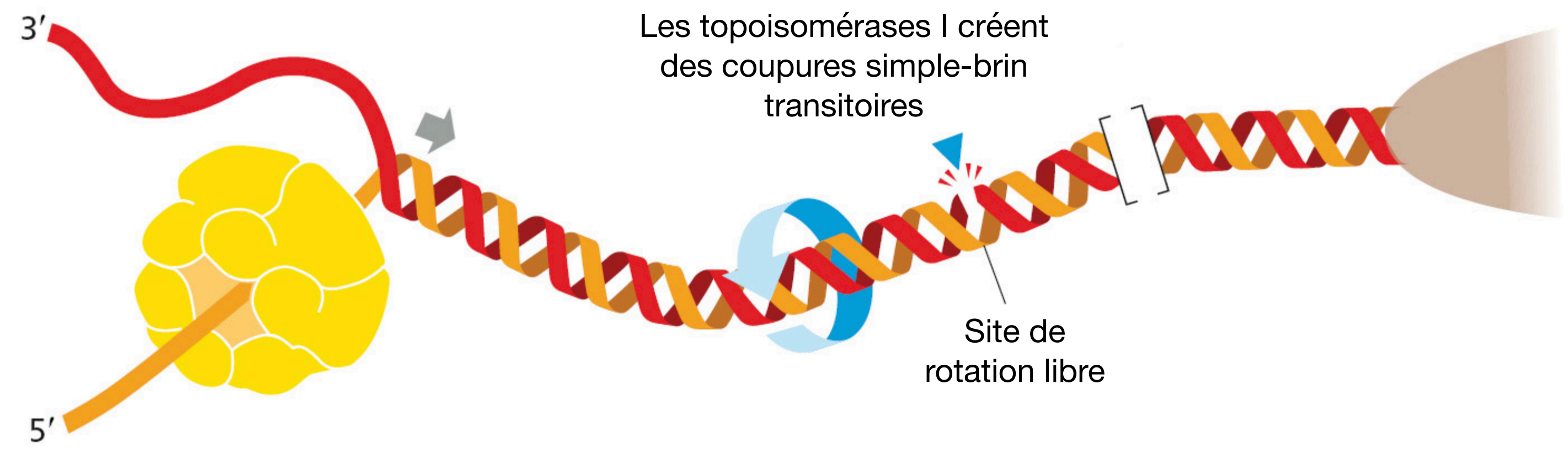
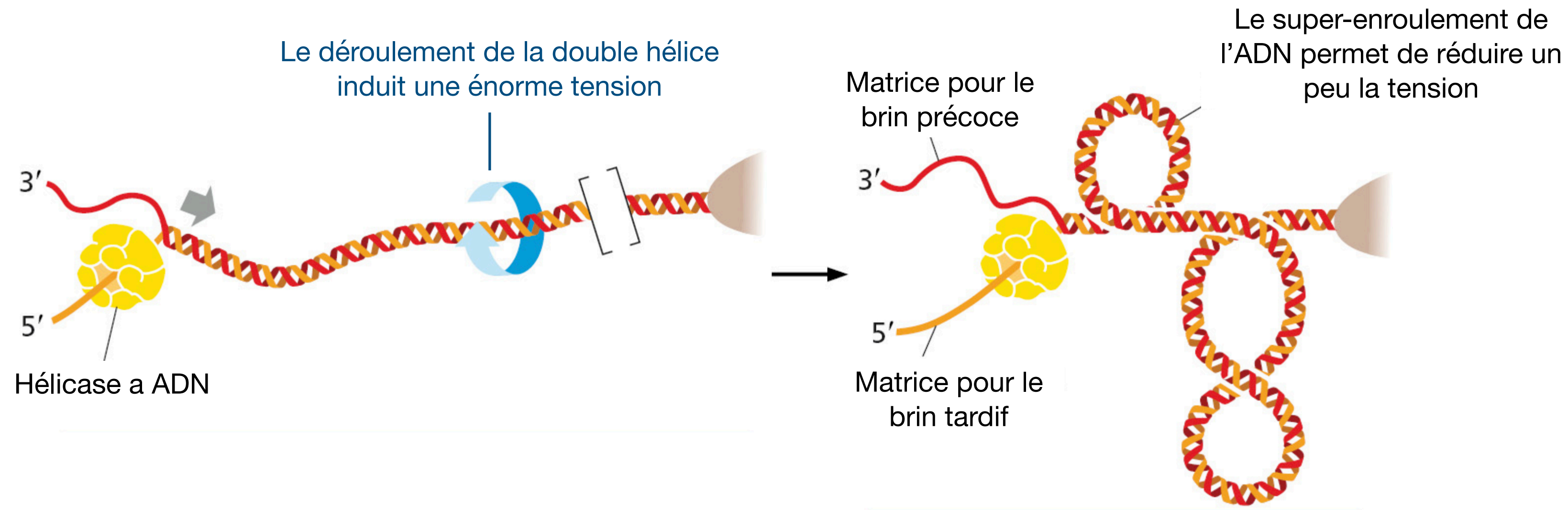
Réparation des mésappariements (mismatch)



Réplication de l'ADN

- 1- La réplication semi-conservative*
- 2- Yeux, fourches et domaines de rélications*
- 3- Le "mix" réplicatif*
- 4- Synthèse de l'ADN*
- 5- Initiation de la réplication*
- 6- Elongation de la réplication*
- 7- La fidélité lors de la réplication*
- 8- Le problème topologique**
- 9- Les télomères*
- 10- Applications*

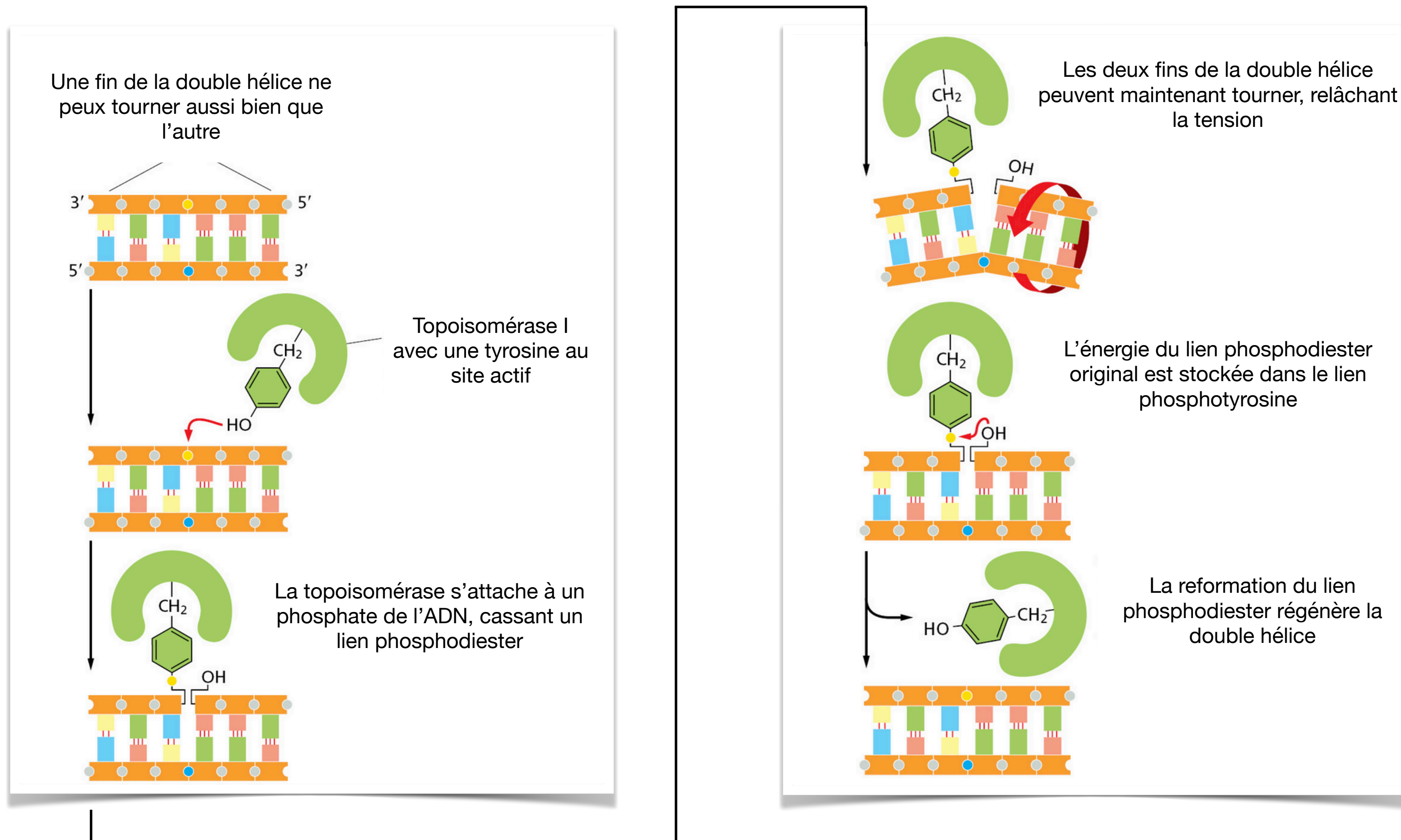
Le problème topologique



Le **stress de torsion** sur l'ADN double-brin devant l'hélicase est relâché par la **rotation libre** de l'ADN autour des liens phosphodiester de l'autre côté de la cassure simple-brin. La même topoisomérase **réparera la cassure**.

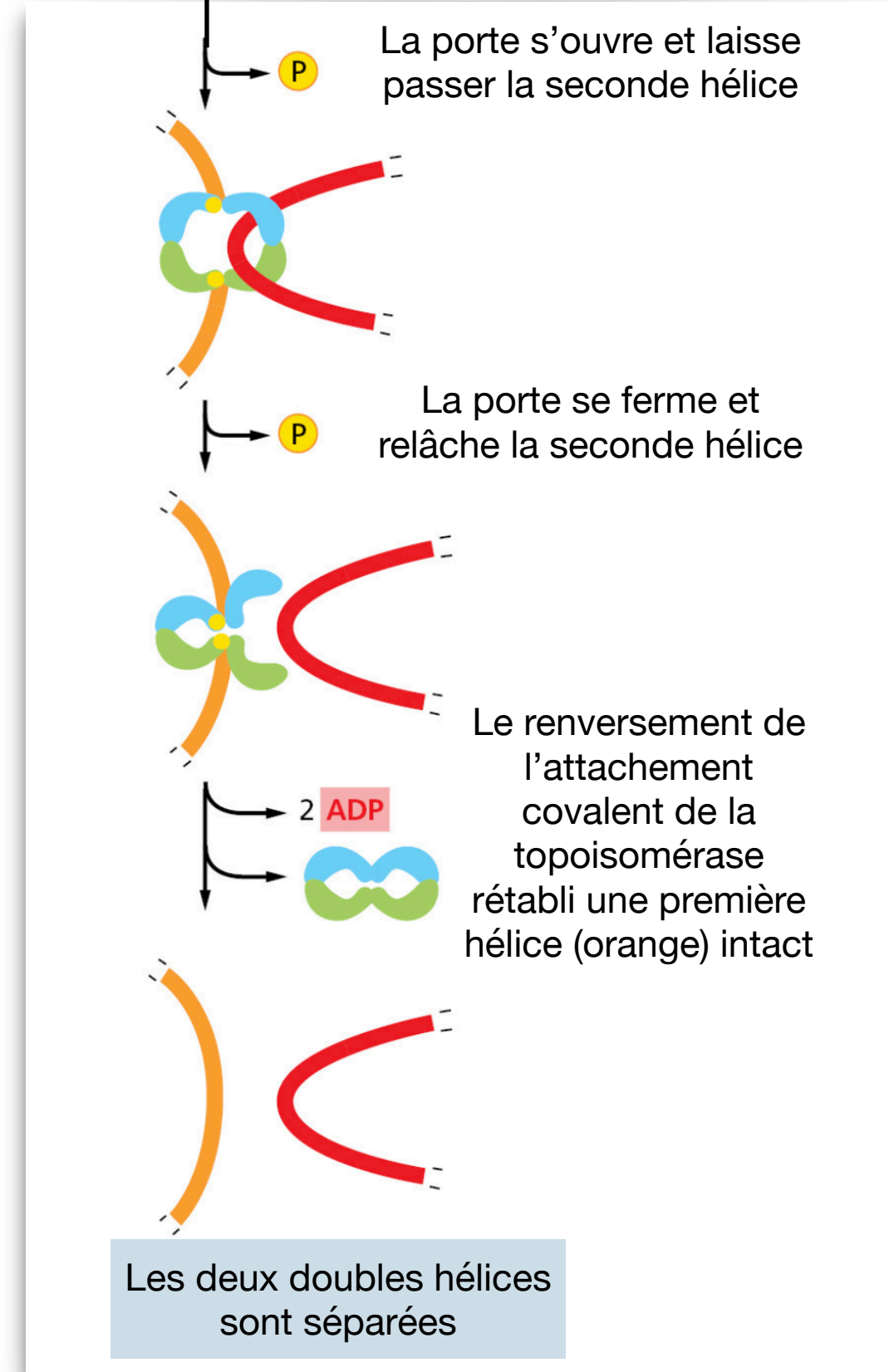
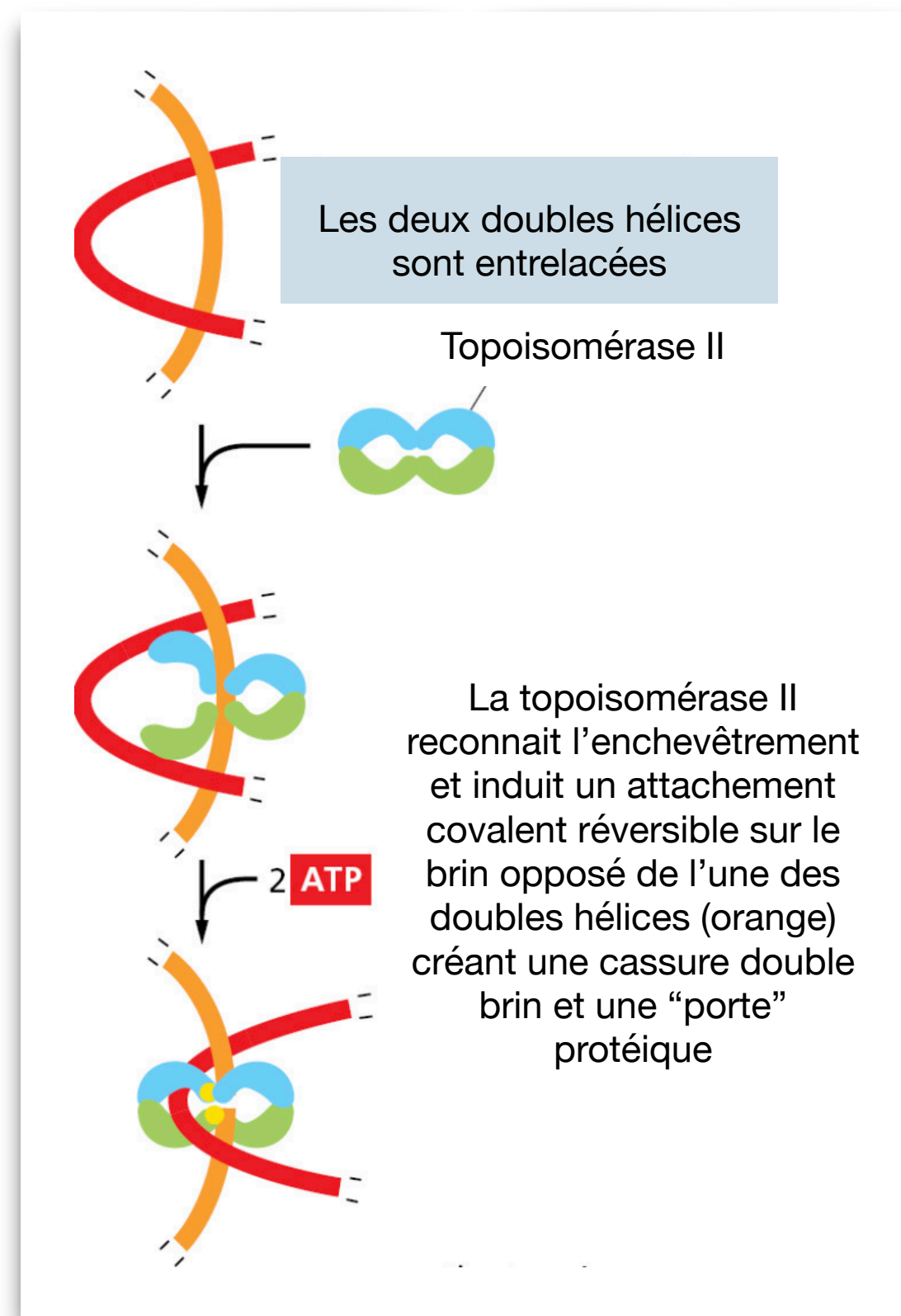
Le problème topologique

1- Topoisomérases I: coupure simple-brin



Le problème topologique

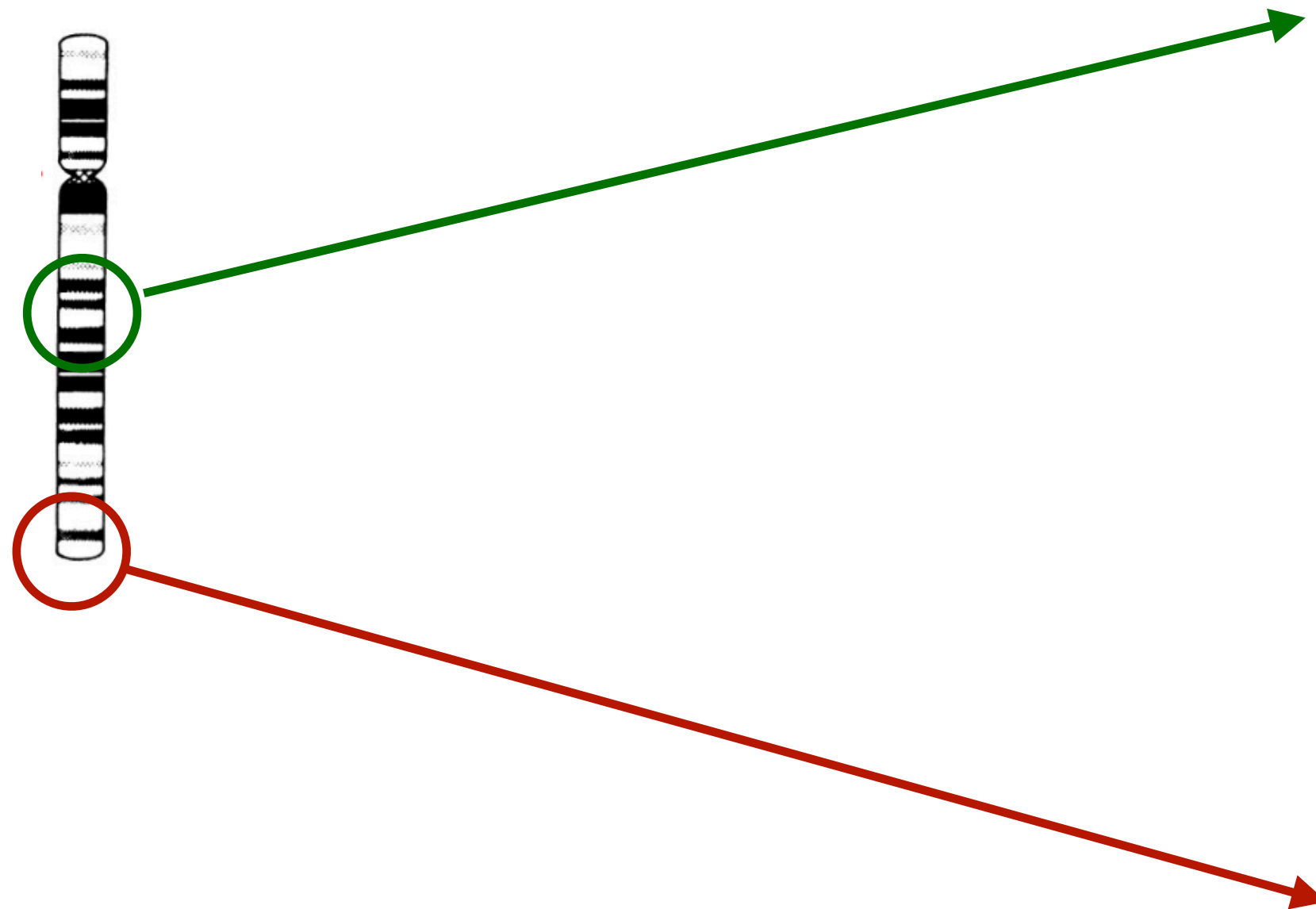
2- Topoisomérases II: coupure double-brin



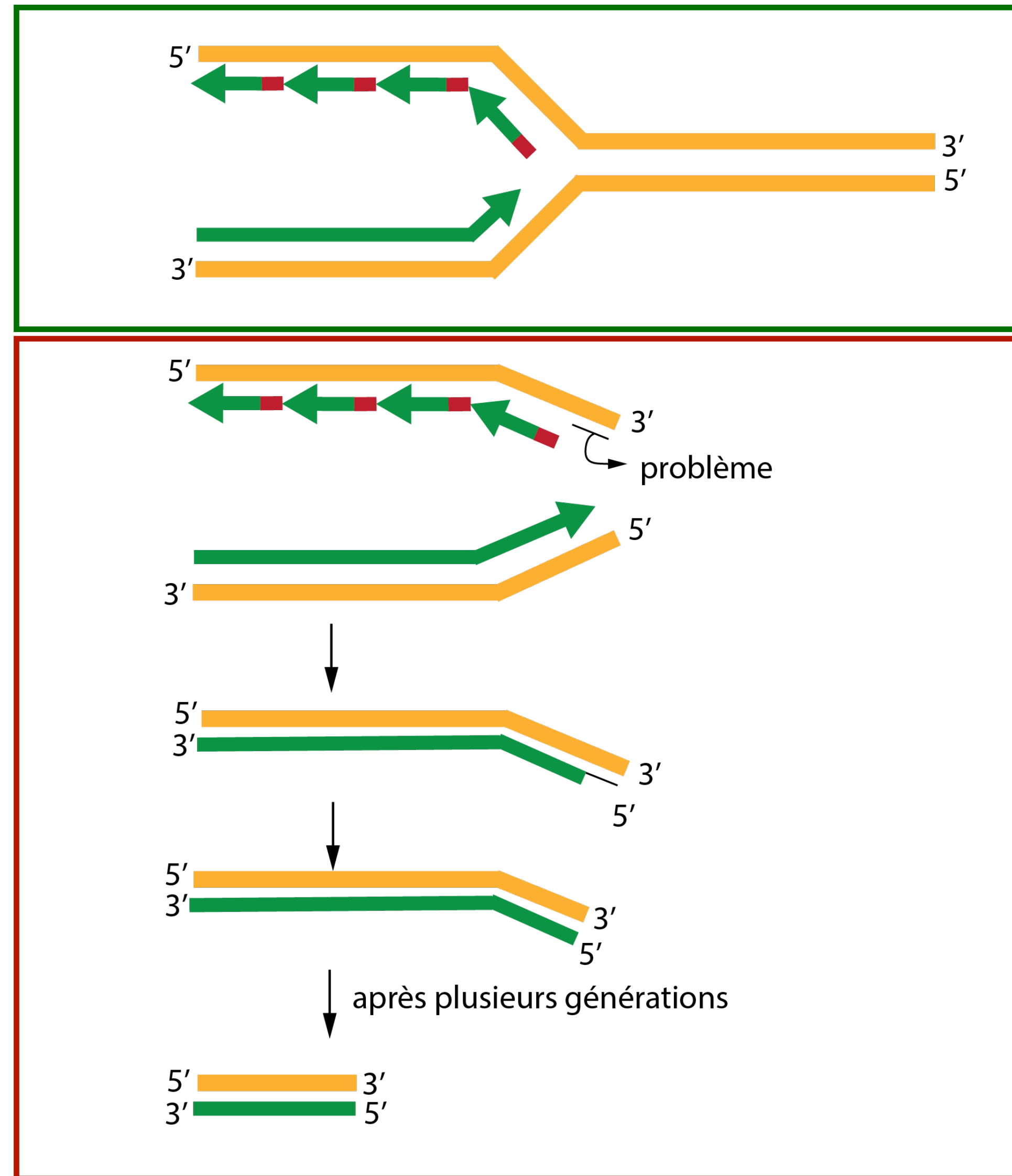
Réplication de l'ADN

- 1- La réplication semi-conservative*
- 2- Yeux, fourches et domaines de rélications*
- 3- Le "mix" réplicatif*
- 4- Synthèse de l'ADN*
- 5- Initiation de la réplication*
- 6- Elongation de la réplication*
- 7- La fidélité lors de la réplication*
- 8- Le problème topologique*
- 9- Les télomères**
- 10- Applications*

L'extrémité des chromosome: les télomères



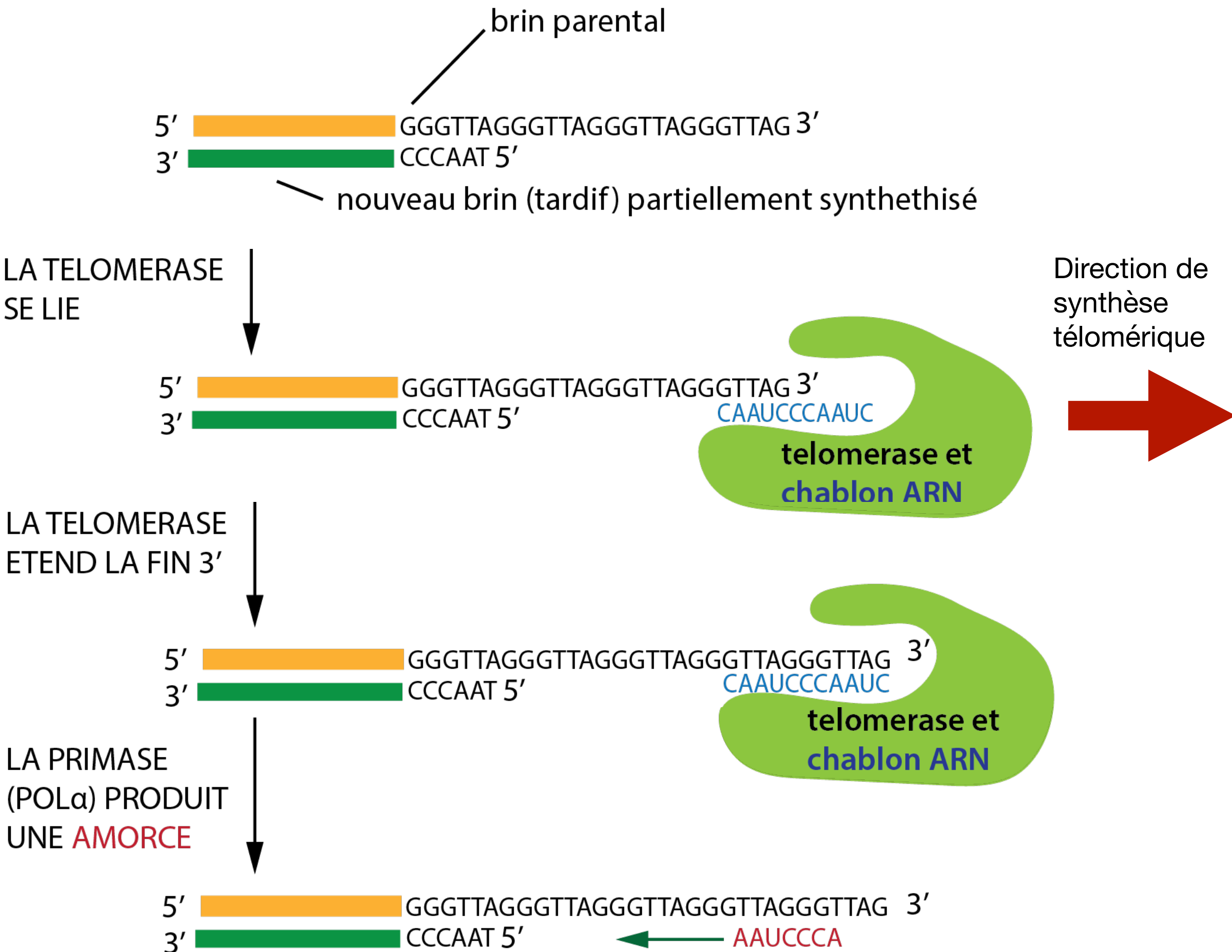
- > la taille des télomères détermine l'âge des cellules
- > lorsque les télomères sont trop petits, les cellules deviennent sénescents.



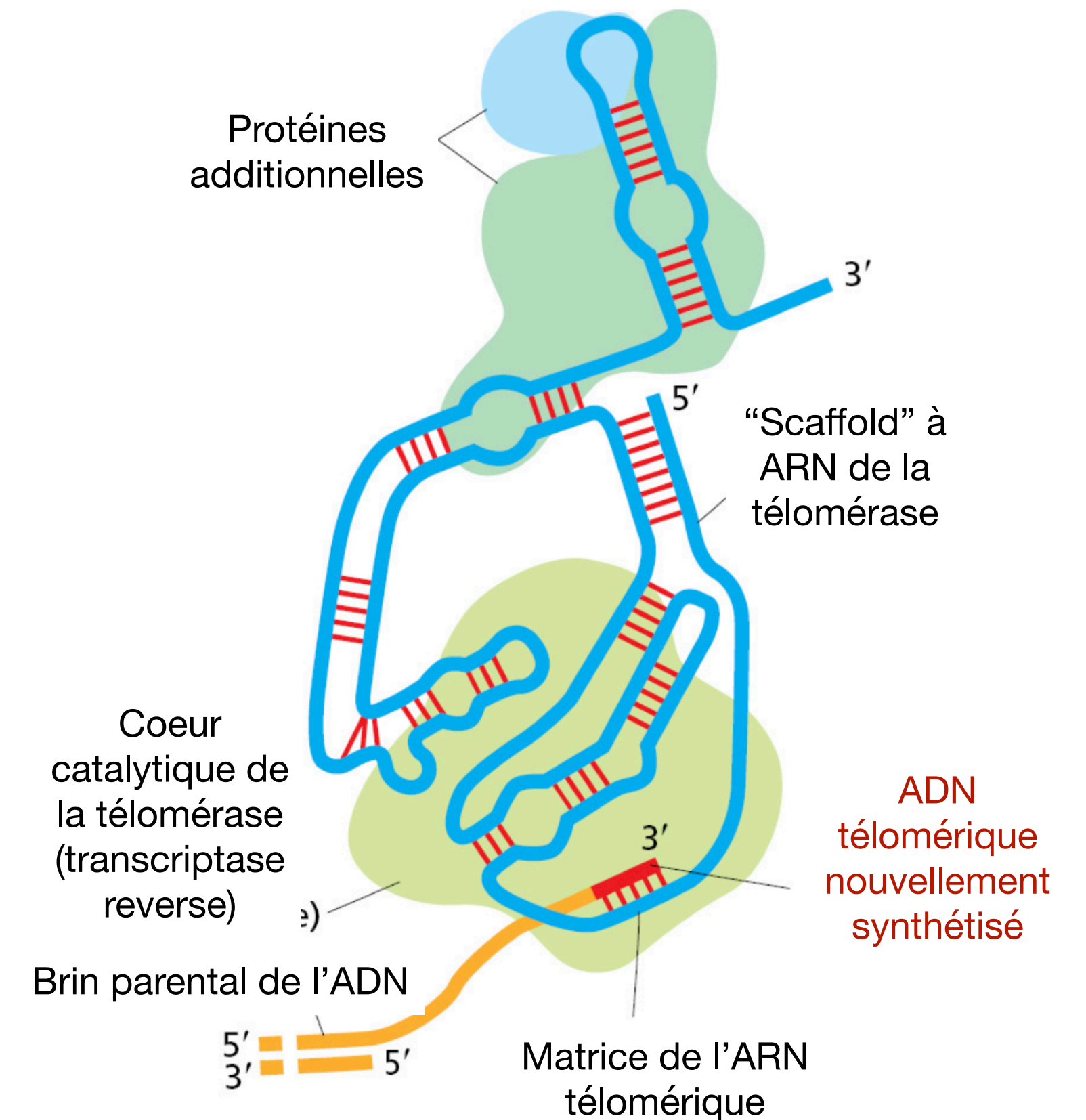
L'extrémité des chromosome: les télomères

Les télomères sont composés de séquences répétées (TTAGGG)

Pour anticiper le problème de la réduction des télomères, une enzyme, **la télomérase**, augmente leur taille



La télomérase



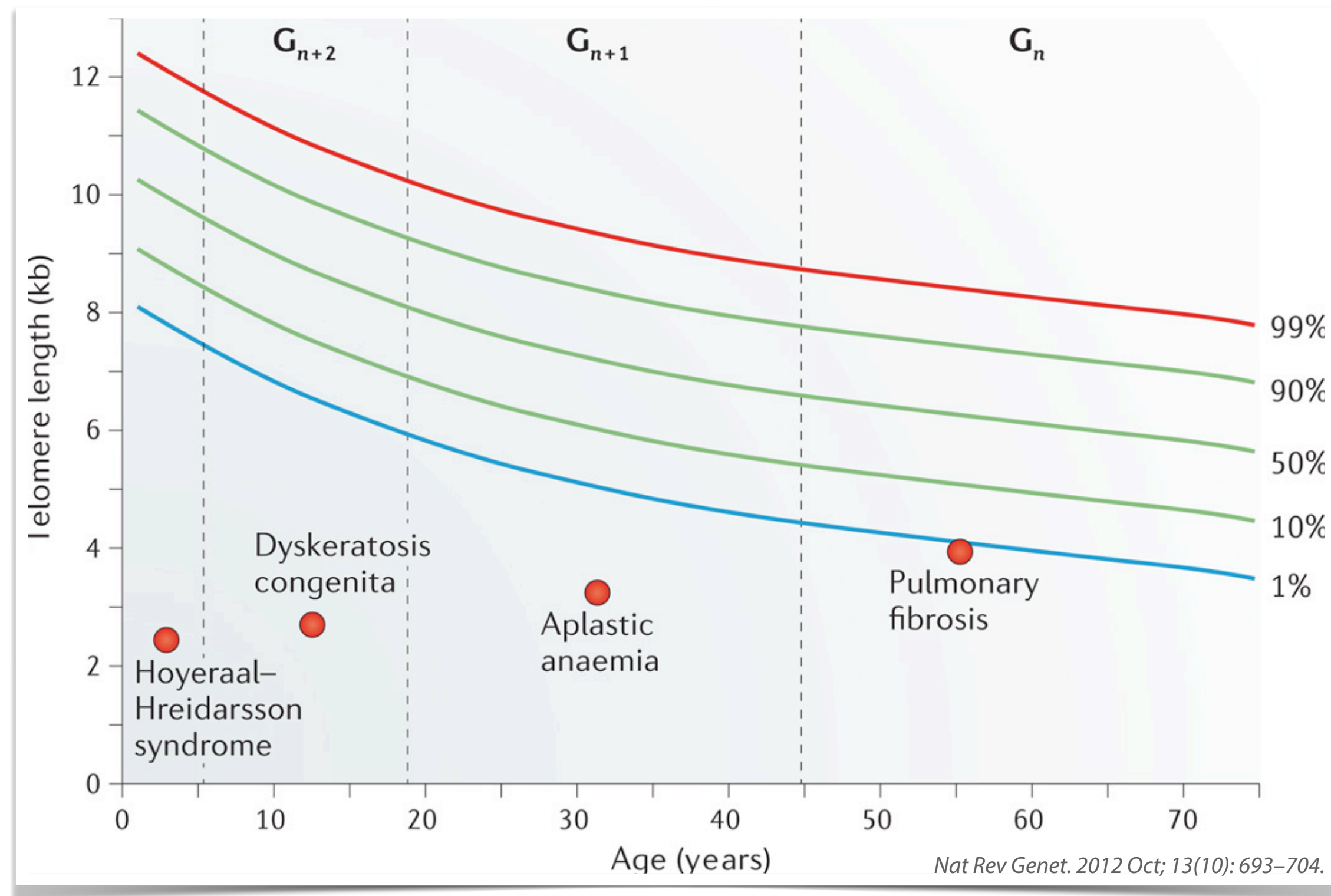
Activité de la télomérase

- Principalement cellules souches et germinales
- Principalement phase S, mais aussi G2 et M du cycle cellulaire

L'extrémité des chromosome: les télomères

Short Telomere Syndromes (STS): pertes de fonction de la télomérase

Longueur des télomères en fonction de l'âge



Cancers et gain de fonction de la télomérase

Fréquence de mutations dans le promoteur du gène de la télomérase (*hTERT*) dans divers cancers

Cancer type	Mutation frequency (%)
Bladder carcinoma	47-85
Renal pelvic carcinoma	60-64
Urothelial carcinoma	47
Hepatocellular carcinoma	24-59
Melanoma	67-85
Skin basal cell carcinoma	39-74
Thyroid cancer (papillary and poorly differentiated carcinomas)	50-52
Myxoid liposarcoma	74-79
Glioblastoma	28-84
Medulloblastoma	19-42
Oligoastrocytoma Oligodendroglioma	25-53 72
Breast cancer, colorectal cancer, medullary thyroid carcinoma, ovarian cancer, esophageal adenocarcinoma, acute myeloid leukemia, chronic lymphoid leukemia, pancreatic cancer, prostate cancer, testicular carcinoma, uterine cervix cancer	0-5

Jafri, et al., Genome Med 8, 69 (2016).

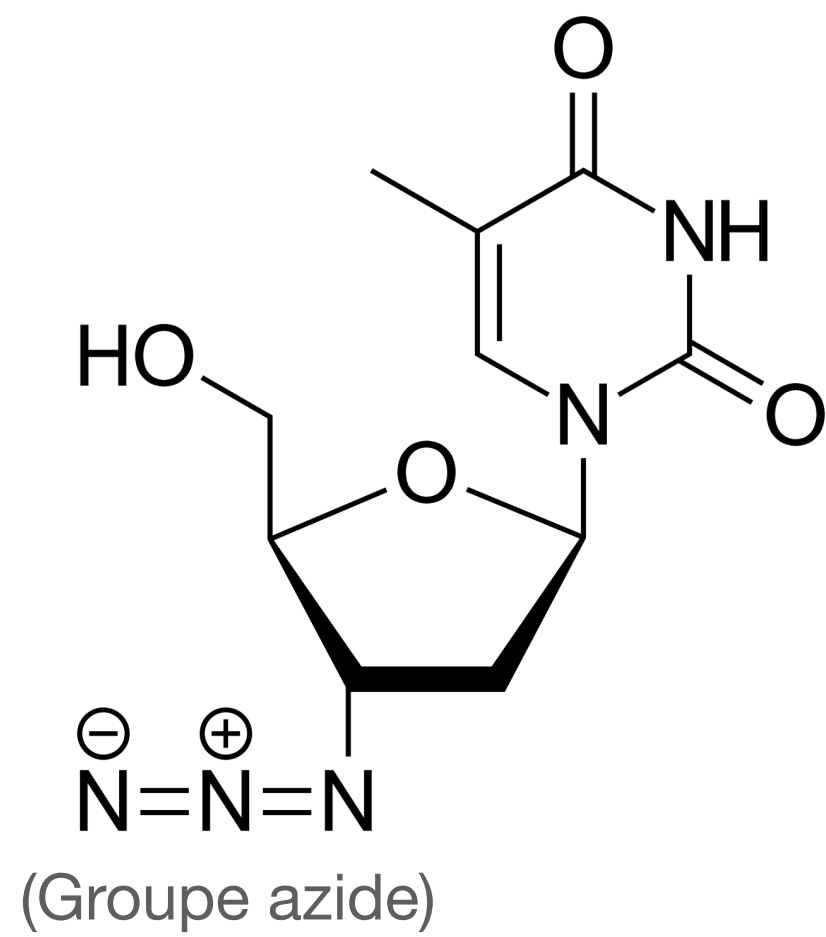
Réplication de l'ADN

- 1- La réplication semi-conservative*
- 2- Yeux, fourches et domaines de rélications*
- 3- Le "mix" réplicatif*
- 4- Synthèse de l'ADN*
- 5- Initiation de la réplication*
- 6- Elongation de la réplication*
- 7- La fidélité lors de la réplication*
- 8- Le problème topologique*
- 9- Les télomères*
- 10- Applications**

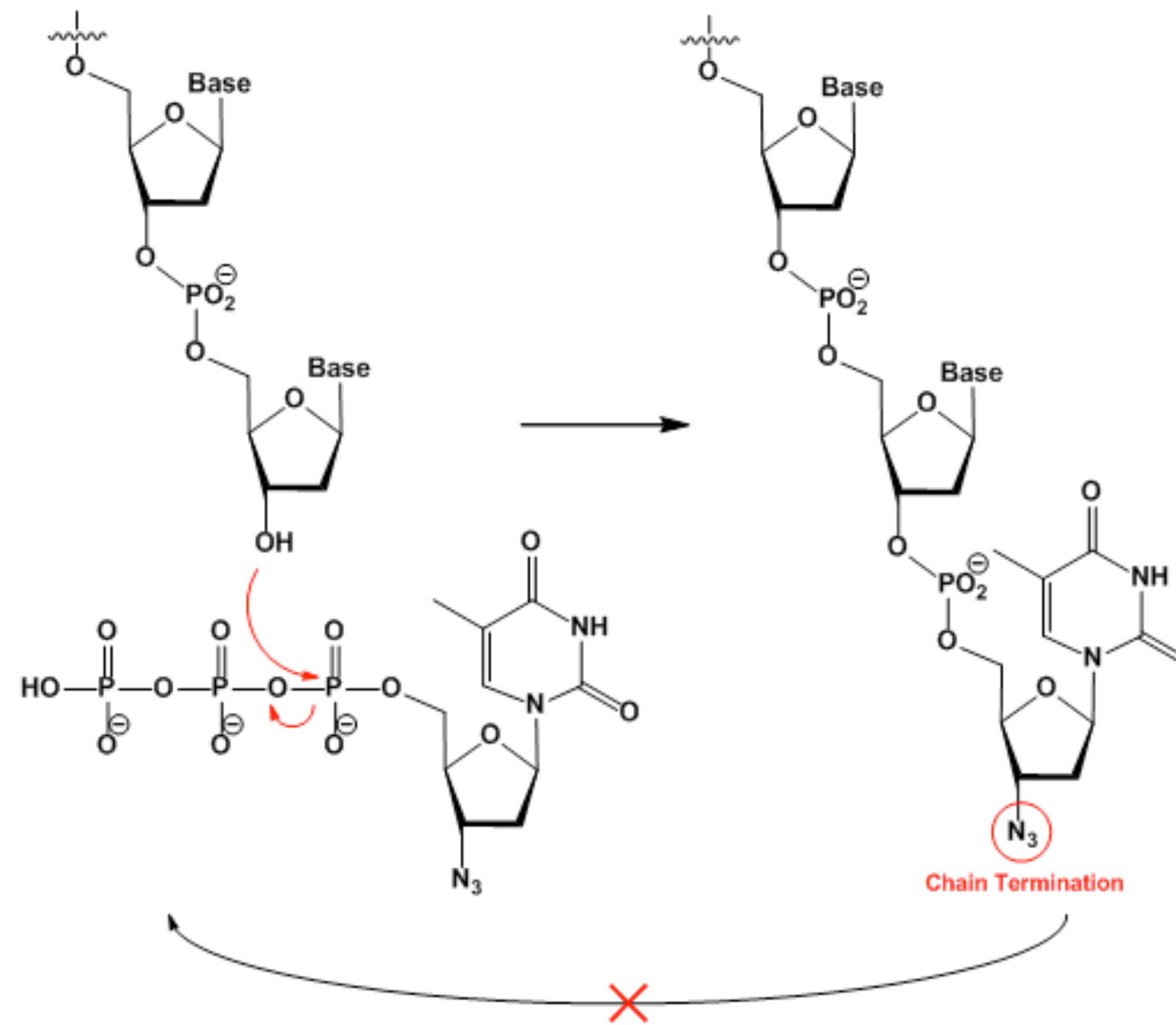
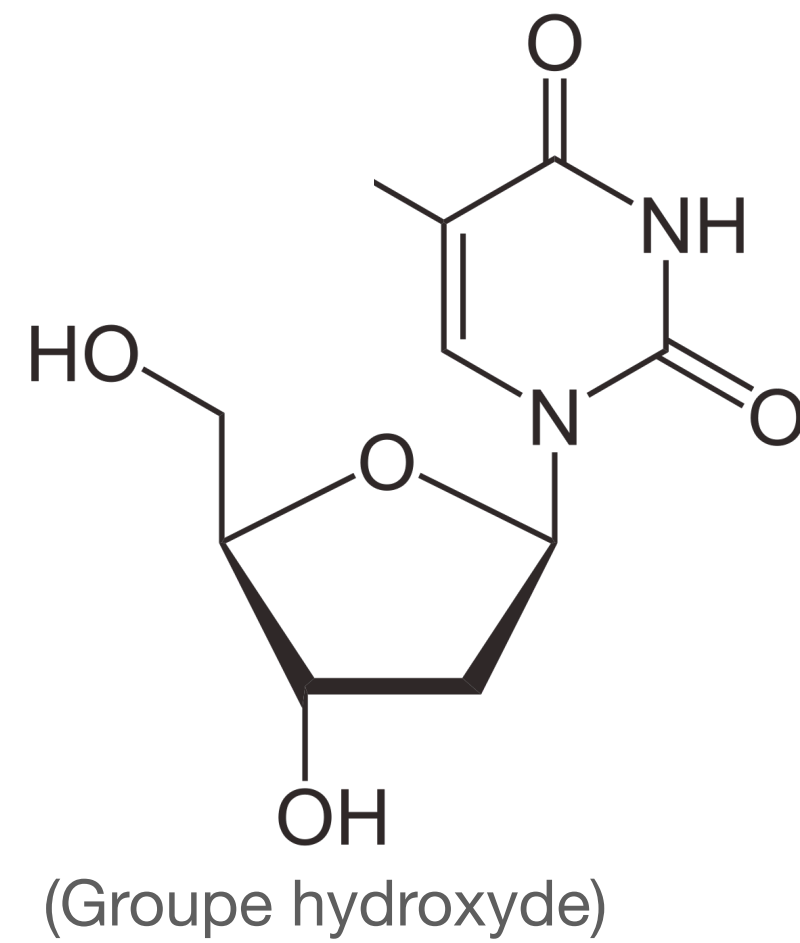
Applications: la réplication comme cible thérapeutique

Analogues de nucléosides

azidothymidine (AZT)
anti-VIH



A comparer:
Thymine



Une 15aine d'autres analogues existent comme:

-> 2', 2'-difluoro 2'deoxycytidine: chimiothérapie pour différents types de cancers.

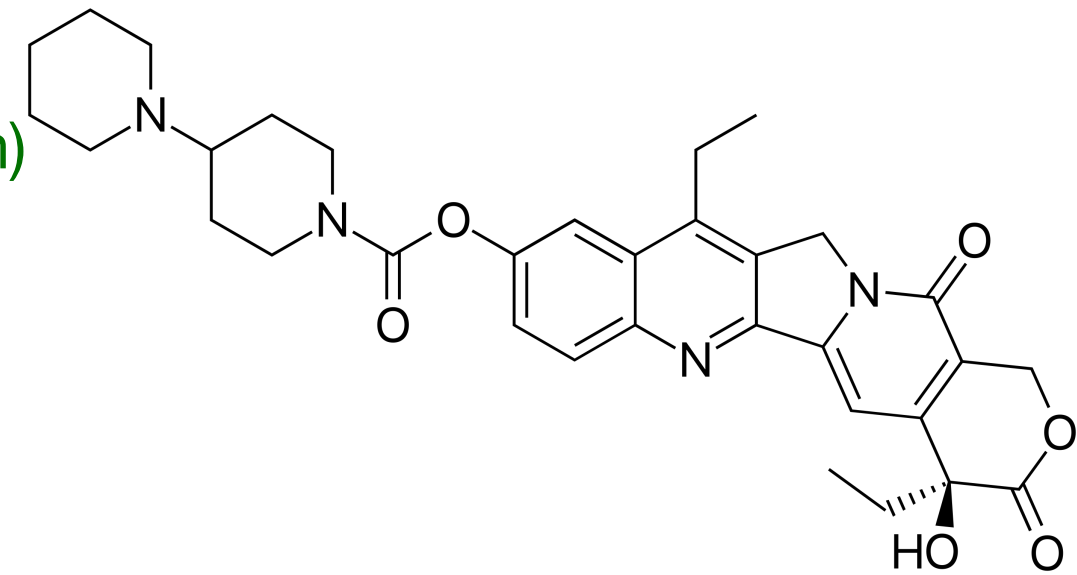
-> Acycloguanosine (acyclovir): Herpes

Applications: la réplication comme cible thérapeutique

Inhibiteurs d'enzyme créant une instabilité génétique cytotoxique...

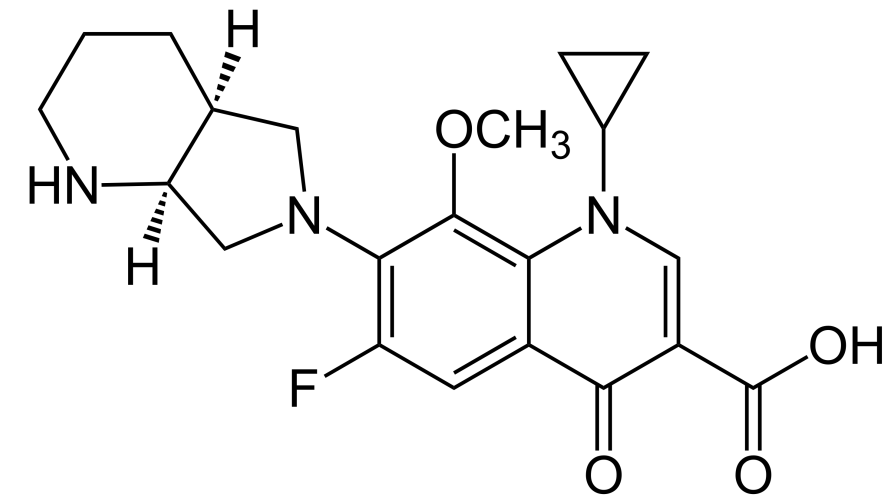
Topoisomerase I

anticancer (exemple: Irinotecan)

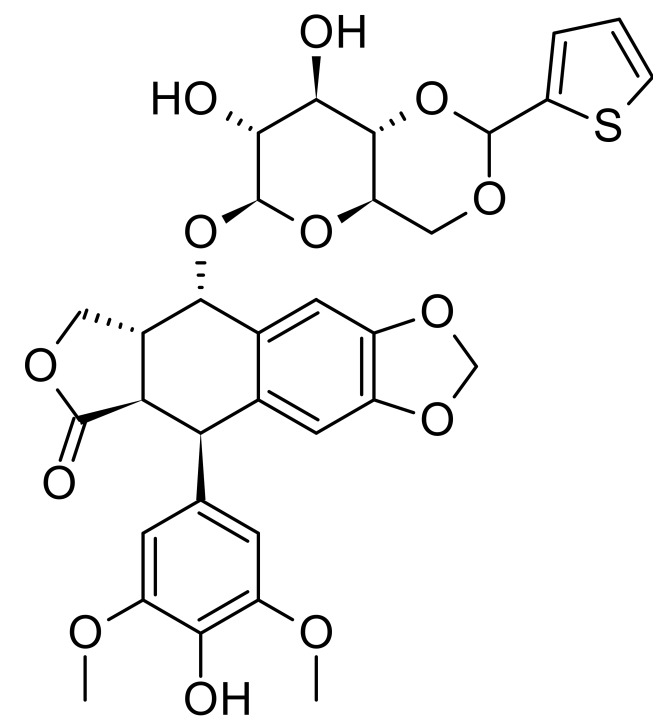


Topoisomerase II

antibiotique (exemple: Moxifloxacin)

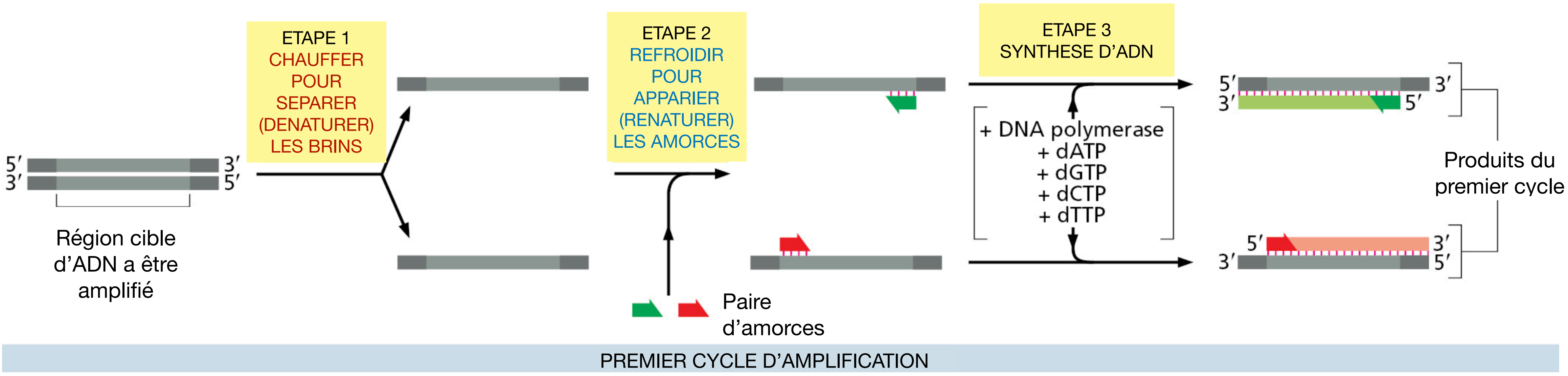


anticancer (exemple: Teniposide)



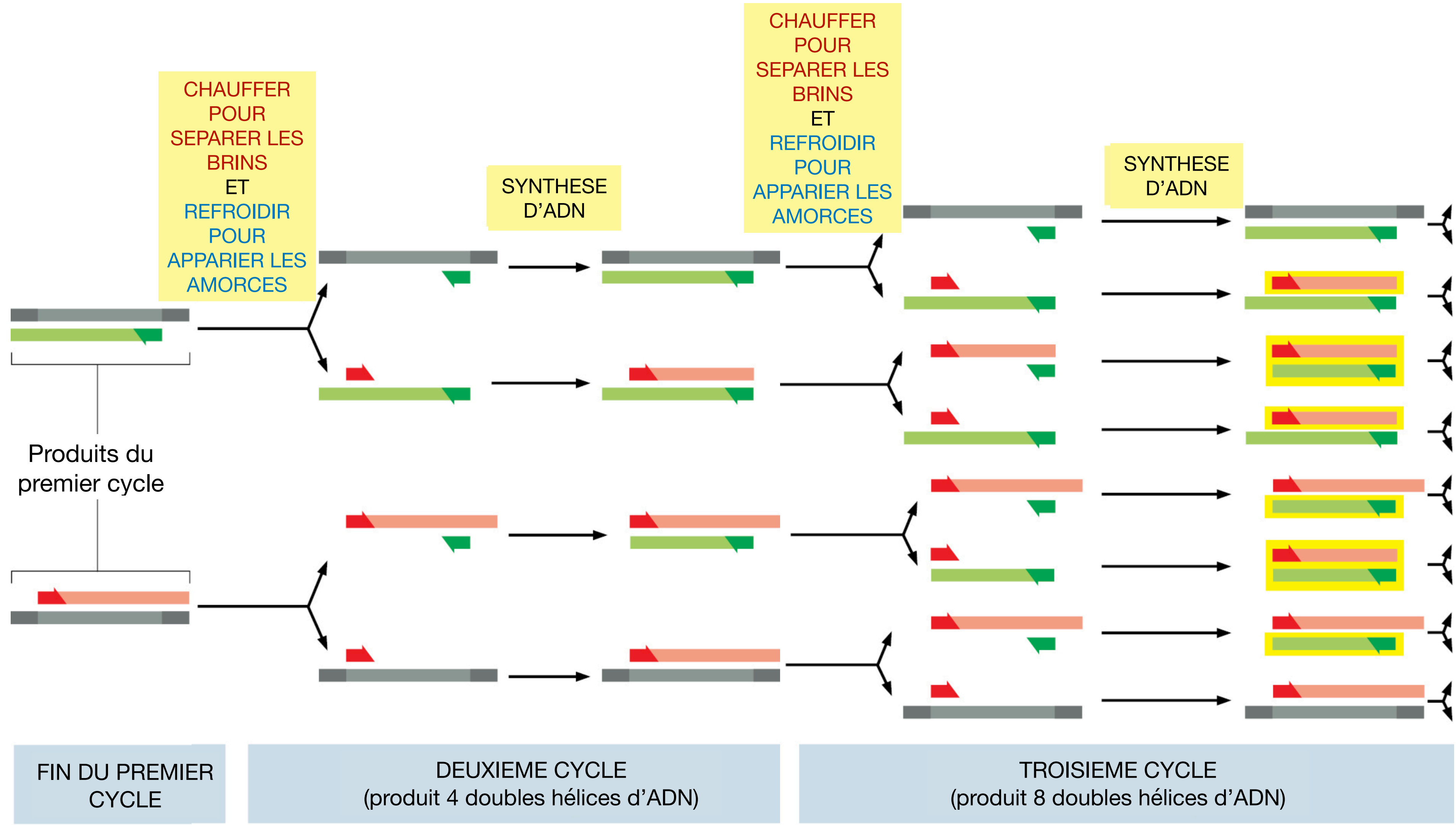
Applications: La PCR et la PCR quantitative

La PCR: polymerase chain reaction



Applications: La PCR et la PCR quantitative

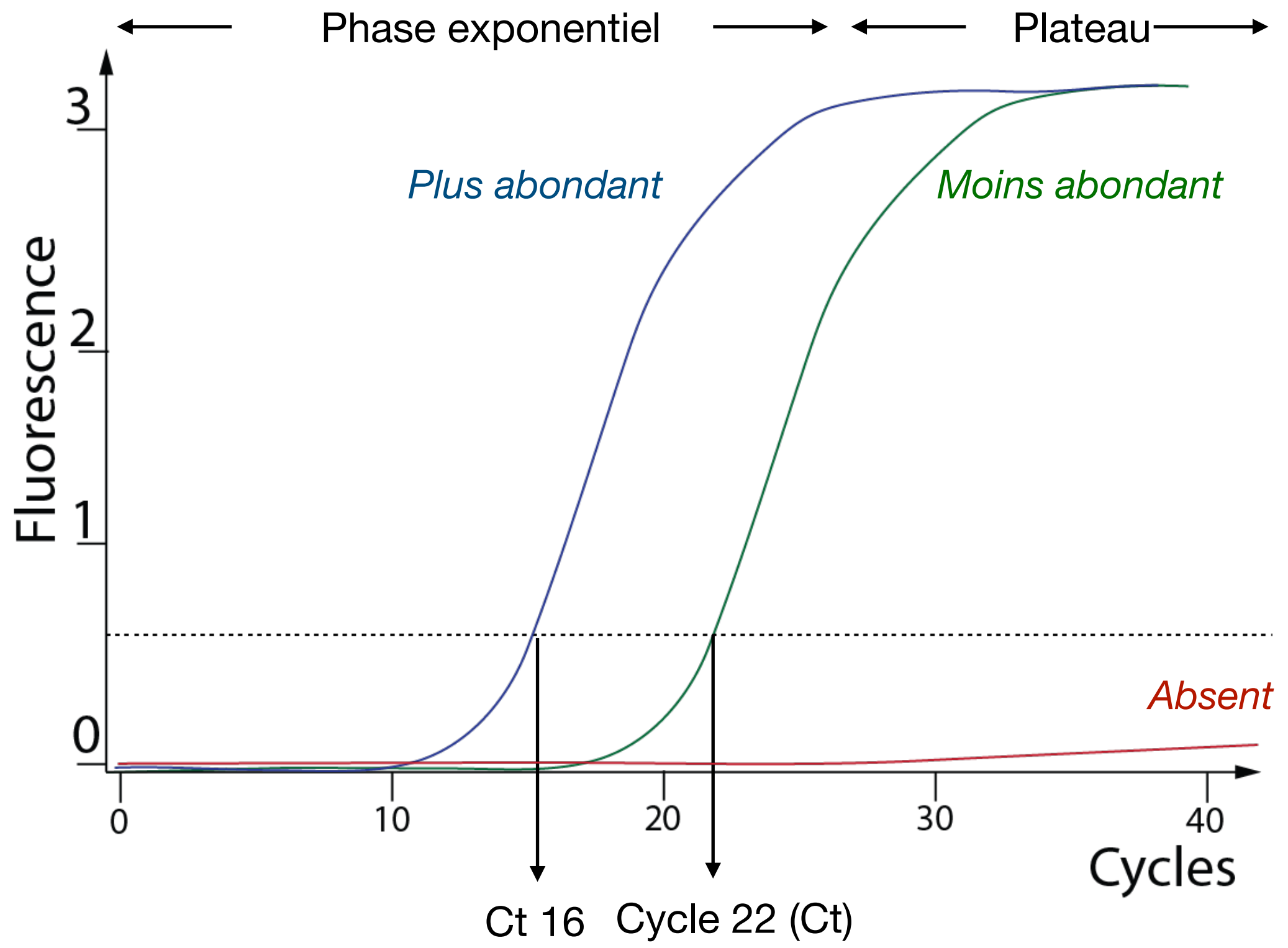
La PCR: polymérase chain reaction



Applications: La PCR et la PCR quantitative

La PCR: polymerase chain reaction

En rendant les produits de la réaction fluorescents, il est possible de suivre la réaction en temps réel (Real-Time PCR ou RT-PCR)



Applications: La PCR et la PCR quantitative

La PCR: polymérase chain reaction

En rendant les produits de la réaction fluorescents, il est possible de suivre la réaction en temps réel (Real-Time PCR ou RT-PCR)

